

Université de Montréal

Rôle de la protéine kinase B (Akt) dans la phosphorylation des histones désacétylases 5 (HDAC5) et l'expression de l'*early growth response protein-1* (Egr-1) induites par l'angiotensine II dans les cellules musculaires lisses vasculaires

Par

Vanessa Truong

Faculté de médecine, Programme des sciences biomédicales

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M. Sc.)

en sciences biomédicales, option sciences cardiovasculaires

Janvier 2020

© Vanessa Truong, 2020

Université de Montréal

Unité académique : Programme des Sciences Biomédicales, Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

Rôle de la protéine kinase B (Akt) dans la phosphorylation des histones désacétylases 5 (HDAC5) et l'expression de l'*early growth response protein-1* (Egr-1) induites par l'angiotensine II dans les cellules musculaires lisses vasculaires

Présenté par

Vanessa Truong

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

John Chan

Président-rapporteur

Ashok K. Srivastava

Directeur de recherche

Madhu B. Anand-Srivastava

Codirectrice

Réjean Couture

Membre du jury

Résumé

Une augmentation de la concentration de l'angiotensine II (Ang II) contribue à la prolifération, la migration et l'hypertrophie des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) par l'activation des voies des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) et de la *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K)/protéine kinase B (PKB/Akt). L'Ang II induit l'activation du facteur de transcription *early growth response protein-1* (Egr-1) et sa suractivation est remarquée dans les lésions athérosclérotiques et les modèles animaux de lésions vasculaires. La régulation des facteurs de transcription est effectuée par des histones désacétylases (HDACs) qui désacétylent les lysines des histones et protéines non-histones. L'Ang II induit la phosphorylation et l'export nucléaire de la classe IIa des HDACs, particulièrement les HDAC5, et une augmentation de celles-ci est observée dans les maladies vasculaires. L'Ang II est un puissant activateur des voies des MAPK et de la PI3K/Akt, toutefois l'implication de ces voies dans la phosphorylation des HDAC5 et l'expression de l'Egr-1 dans les CMLVs reste inexplorée. Dans cette étude, l'Ang II a induit la phosphorylation des HDAC5 sur la sérine 498 dans les A10 CMLVs. Un blocage pharmacologique de l'*extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2) par U0126 n'a montré aucun effet significatif sur la phosphorylation et l'exclusion nucléaire des HDAC5 induite par l'Ang II. Par contre, l'inhibition de la voie PI3K par *wortmannin*, de l'Akt par SC66 ou le knockdown de l'Akt par des petits ARN interférents (siRNA) a atténué la phosphorylation et l'export nucléaire des HDAC5 induits par l'Ang II. Par ailleurs, l'inhibition de l'Akt ou le knockdown de cette kinase a diminué l'expression de l'Egr-1 induite dans les CMLVs stimulées par l'Ang II. L'inhibition des HDACs de la classe IIa par MC1568 ou TMP-195 ou bien le knockdown des HDAC5 a diminué l'expression de l'Egr-1 induite par l'Ang II. De plus, le blocage de l'export nucléaire des HDAC5 par la leptomycine B ou la KPT-330 a empêché la localisation cytoplasmique des HDAC5 et a atténué l'expression de l'Egr-1 en réponse à une stimulation de l'Ang II. L'hypertrophie vasculaire induite par l'Ang II a pu être inhibée par la suppression de l'HDAC5 et l'Egr-1. En conclusion, l'Ang II induit la phosphorylation et l'exclusion nucléaire des HDAC5 par la voie PI3K/Akt et non celle de ERK1/2; de plus, l'Ang II induit l'expression de l'Egr-1 à l'aide des HDAC5 via la voie Akt contribuant ainsi à l'hypertrophie des CMLVs.

Mots-clés : Ang II, Egr-1, HDAC5, PI3K/Akt, hypertrophie, cellules musculaires lisses vasculaires

Abstract

Elevated concentration of angiotensin II (Ang II) contributes to vascular smooth muscle cells (VSMCs) proliferation, migration and hypertrophy by the activation of the mitogen-activated protein kinases (MAPK) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB/Akt) pathways. Ang II induced the expression of early growth response protein-1 (Egr-1), which is a transcription factor that is upregulated in atherosclerosis lesions and in animal models of vascular injuries. The activation or derepression of gene transcription is mediated by histone deacetylases (HDACs), which deacetylate lysine residues from histone and non-histones proteins. Ang II-induced the phosphorylation and nuclear export of class IIa HDACs, notably HDAC5, and its elevated activation is observed in vascular pathologies. Ang II is a potent activator of the MAPK and PI3K/Akt pathways, however their implication in the phosphorylation of HDAC5 and Egr-1 expression in VSMCs remain unexplored. In this study, Ang II-induced HDAC5 phosphorylation at serine 498 in A10 VSMCs and pharmacological blockade of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) by U0126 did not affect the phosphorylation and nuclear exclusion of HDAC5 in response to Ang II. Whereas, pharmacological inhibition of the PI3K by wortmannin, Akt by SC66 or small interfering RNA (siRNA)-induced silencing of Akt attenuated Ang II-induced HDAC5 phosphorylation and its nuclear export. Furthermore, inhibition or knockdown of Akt suppressed Ang II-induced Egr-1 expression. In addition, the inhibition of class IIa HDAC5 by MC1568, TMP-195 or HDAC5 knockdown by siRNA reduced Ang II-induced Egr-1 expression. The blockade of the nuclear export of HDAC5 by leptomycin B or KPT-330 prevented the cytoplasmic localization of HDAC5 and attenuated the expression of Egr-1 by Ang II in VSMCs. Moreover, HDAC5 or Egr-1 depletion prevented Ang II-induced cell hypertrophy. In summary, Ang II-induced HDAC5 phosphorylation and its nuclear export is mediated by the PI3K/Akt and not the ERK1/2 pathway, in addition, Ang II-induced Egr-1 expression involves the implication of HDAC5 via the Akt pathway which subsequently leads to VSMC hypertrophy.

Keywords: Ang II, Egr-1, HDAC5, PI3K/Akt, hypertrophy, vascular smooth muscle cells

Table des matières

Résumé	3
Abstract	5
Table des matières	6
Liste des tableaux.....	10
Liste des figures.....	11
Liste des sigles et abréviations.....	12
Remerciements	16
Chapitre 1 – Introduction	17
1.1 Historique de l'angiotensine	19
1.2 Système rénine-angiotensine (SRA)	20
1.3 Angiotensine II et ses dérivées.....	21
1.4 Régulation de l'angiotensine II.....	22
1.5 Récepteurs de l'angiotensine II et ses dérivés	22
1.5.1 Récepteurs de l'angiotensine de type 1.....	23
1.5.2 Récepteurs de l'angiotensine de type 2.....	23
1.5.3 Récepteurs de l'angiotensine de type 4.....	24
1.5.4 Récepteurs Mas et <i>Mas-related G-protein-coupled receptor member D</i>	24
1.6 Angiotensine II et ses cascades signalétiques dans le système vasculaire	25
1.6.1 Cascades signalétiques couplées aux protéines G	25
1.6.2 Cascades signalétiques des <i>mitogen-activated protein kinases</i>	26
1.6.3 Cascades signalétiques de la <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>	28

1.6.4 Cascade signalétique de l'oxydase NADPH/NADH.....	30
1.7 Angiotensine II et ses effets pathophysiologiques sur le système vasculaire	31
1.7.1 Hypertension	31
1.7.2 Athérosclérose	32
2.1 <i>Early growth response protein-1</i> (Egr-1)	33
2.2 Structure et régulation de l' <i>early growth response protein-1</i>	33
2.3 Cascades signalétiques induisant l'expression de l' <i>early growth response protein-1</i> dans les cellules musculaires lisses.....	34
2.4 <i>Early growth response protein-1</i> et les maladies cardiovasculaires	35
3.1 Modifications des histones	37
3.2 Histones acétylases et histones désacétylases	37
3.3 Famille des HDACs.....	37
3.3.1 Classe I	38
3.3.2 Classe II	38
3.3.3 Classe III	38
3.3.4 Classe IV.....	39
3.4 Classe IIa des HDACs.....	40
3.4.1 Structure et partenaires d'interaction de la classe IIa des HDACs.....	40
3.4.2 Activité catalytique de la classe IIa des HDACs	40
3.4.3 Sites de phosphorylation des HDAC4 et HDAC5	41
3.4.4 Navette nucléocytoplasmique (<i>nucleocytoplasmic shuttling</i>) des HDAC4 et HDAC5...41	
3.4.5 <i>Phosphorylation-dependent nucleocytoplasmic shuttling</i> des HDAC4 et HDAC5 dans les cellules musculaires lisses vasculaires	42
3.4.5.1 Protéine kinase C (PKC) - Protéine kinase D (PKD).....	43

3.4.5.2 <i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)</i>	43
3.5 Classe IIa des HDACs et les pathologies vasculaires	44
3.5.1 Hypertrophie cardiaque	44
3.5.2 Athérosclérose	45
3.5.3. Hypertension	46
3.6 Inhibition des HDACs	46
3.6.1 Inhibiteurs de la classe IIa des HDACs.....	48
4.1 Hypothèses et buts de cette étude	50
Chapitre 2 – Article.....	52
Abstract	53
1. Introduction.....	54
2. Materials and methods	56
3. Results	59
4. Discussion	63
5. Figures	65
6. Figure legends	74
7. Acknowledgments.....	77
8. Conflict of interest.....	77
9. Author contributions.....	77
10. References.....	78
Chapitre 3 – Discussion générale	83
Chapitre 4 – Conclusion	88
Références bibliographiques.....	90

Annexes108

Résultats supplémentaires108

Liste des tableaux

Tableau 1. –	Les inhibiteurs des histones désacétylases	47
Tableau 2. –	Les effets des inhibiteurs des HDACs sur le système vasculaire	48

Liste des figures

Figure 1. –	Les différentes tuniques de la paroi d'un vaisseau sanguin	18
Figure 2. –	Le changement de phénotype des cellules musculaires lisses vasculaires.....	19
Figure 3. –	La voie classique du système rénine-angiotensine	21
Figure 4. –	Les cascades signalétiques de l'angiotensine II couplée aux protéines G du récepteur de l'angiotensine de type 1 dans les cellules musculaires lisses vasculaires.....	26
Figure 5. –	Les cascades signalétiques des <i>mitogen-activated protein kinases</i> induites par l'angiotensine II dans les cellules musculaires lisses vasculaires.....	28
Figure 6. –	La cascade signalétique de la <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> induite par l'angiotensine II dans les cellules musculaires lisses vasculaires.....	30
Figure 7. –	Les cascades signalétiques induisant l'expression de l' <i>early growth response protein-1</i> dans les cellules musculaires lisses	35
Figure 8. –	Les 18 histones désacétylases de l'humain.....	39
Figure 9. –	La structure des histones désacétylases 4 et 5	42
Figure 10. –	Le <i>nucleocytoplasmic shuttling</i> des HDAC5 sur l'activation du facteur de transcription <i>myocyte enhancer factor 2</i>	45
Figure 11. –	Modèle schématisé de la contribution de la voie PI3K/Akt dans la phosphorylation et l'export nucléaire des HDAC5 ainsi que dans l'expression de l'Egr-1 induite par l'Ang II dans les cellules musculaires lisses vasculaires	89

Liste des sigles et abréviations

AA	acide arachidonique
ADN	acide désoxyribonucléique
ASK1	signal d'apoptose régulant la kinase 1
Ang I	angiotensine I
Ang II	angiotensine II
ApoE ^{-/-}	délétion génétique des apolipoprotéines E
ARN	acide ribonucléique
AT ₁ R	récepteurs de l'angiotensine de type 1
AT ₂ R	récepteurs de l'angiotensine de type 2
AT ₄ R	récepteurs de l'angiotensine de type 4
Ca ²⁺	calcium
CaM	calmoduline
CaMKII	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
CMLVs	cellules musculaires lisses vasculaires
COX	cyclooxygénases
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DAG	diacylglycérol
EETs	acides époxyéicosatriénoïques
EGFR	récepteur du facteur de croissance épidermique
Egr-1	<i>early growth response protein-1</i>

eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1 and 2</i>
ET-1	endothéline-1
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HATs	histones acétylases
HDACs	histones désacétylases
HDACi	inhibiteurs des histones désacétylases
HETEs	acides hydroxyeicosatétraénoïques
IGF-1	<i>insulin-like growth factor-1</i>
IP3	inositol-1,4,5-triphosphate
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
KD	knockdown
LO	lipooxygénase
LTs	leucotriènes
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MCVs	maladies cardiovasculaires
MEF2	<i>myocyte enhancer factor 2</i>
MgrD	<i>Mas-related G-protein-coupled receptor member D</i>
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i>
MLCP	<i>myosin light chain phosphatases</i>
NAD ⁺	<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>

N-Cor	<i>nuclear receptor co-repressor</i>
NES	signal d'export nucléaire
NLS	signal de localisation nucléaire
NO	monoxyde d'azote
PA	acide phosphatidique
PC	phosphatidylcholine
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PG	prostaglandine
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PIP ₂	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKB/Akt	protéine kinase B
PKC	protéine kinase C
PKD	protéine kinase D
PLA ₂	phospholipase A ₂
PLC	phospholipase C
PLD	phospholipase D
ROS	espèces réactives de l'oxygène
Rpd3	<i>reduced potassium deficiency 3</i>
S	sérine
Shc	<i>Src homology 2 domain</i>
SHR	rats spontanément hypertendus
Sir2	<i>silent information regulator 2</i>

siRNA	petits ARN interférents
SIRT	<i>sirtuins</i>
SMRT	<i>silencing mediator for retinoid and thyroid receptor</i>
Sos	<i>son of the sevenless</i>
SRA	système rénine-angiotensine
TxA ₂	thromboxane A ₂
WKY	rats normotendus Kyoto-Wistar
WT	<i>wild-type</i>
Zn ²⁺	zinc

Remerciements

Je voudrais remercier mon directeur de recherche Dr Ashok K. Srivastava de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Sous votre supervision et vos multiples encouragements, mes ambitions en tant qu'étudiante en recherche à la maîtrise ont été accomplies. Ce fut un honneur de vous avoir eu comme directeur de recherche. Votre patience, amabilité ainsi que la confiance envers vos étudiants et employés ne seront jamais oubliées. Je voudrais également remercier ma codirectrice Dr Madhu B. Anand-Srivastava pour votre soutien et vos nombreux conseils positifs lors de nos rencontres.

Je voudrais remercier Ashish Jain de m'avoir formé et aidé lors des manipulations en laboratoire. Ta patience, ta bonne humeur et tes conseils dans divers domaines ont rendu mon expérience de travail très agréable.

Je voudrais aussi remercier les membres de mon comité de parrainage pour vos conseils constructifs ainsi que les membres du jury qui vont évaluer mon mémoire.

Je voudrais remercier mes amis et mes collègues du CRCHUM, particulièrement Kadidia, Yvonne, Abel et Ju Jing pour votre aide, écoute et encouragement à travers les mille péripéties de ma vie. Merci infiniment.

Je voudrais notamment remercier mon père et ma mère pour leur support et amour inconditionnels. Merci papa et maman pour tous les sacrifices que vous avez faits pour moi et votre compréhension lors des moments plus difficiles de mon cheminement académique. De plus, je voudrais remercier mon copain Ray pour toujours avoir été à mes côtés et d'avoir cru en moi depuis le début. Merci énormément Ray.

Ce mémoire n'aurait pas été possible sans le soutien de ces personnes.

Un gros merci à vous tous.

Chapitre 1 – Introduction

Selon l'Organisation mondiale de la santé, les maladies cardiovasculaires (MCVs), étant des pathologies qui affectent le cœur et les vaisseaux sanguins, constituent la première cause de mortalité dans le monde (1). En effet, les MCVs touchent annuellement 17,7 millions d'individus, soit 31% des mortalités de la population mondiale (1). Les MCVs sont causées par divers facteurs comme la diète riche en sucres et gras saturés, l'obésité, le mode de vie sédentaire, la consommation élevée d'alcool et de tabac, ainsi que l'hérédité (1-3).

Les MCVs, telles que l'athérosclérose et l'hypertension, sont souvent associées à un remodelage au niveau des vaisseaux sanguins (4). La paroi des vaisseaux sanguins est composée de trois tuniques ayant chacune leurs propres caractéristiques (**Figure 1**) (5,6). L'épaisseur de ces tuniques varie selon le type de vaisseau sanguin. La tunique interne ou intima est composée de cellules endothéliales. Celle-ci est la première paroi qui entoure la lumière des vaisseaux sanguins et est directement en contact avec la circulation sanguine (5). La tunique intermédiaire ou média est formée principalement de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) et de fibres élastiques. Elle régule la contraction et relaxation des vaisseaux sanguins à l'aide des neurofibres du système nerveux sympathique (5). La tunique externe, externa ou adventice, est constituée de fibres de collagènes et d'élastine, de neurofibres, de vaisseaux lymphatiques, ainsi que des *vasa vasorum* qui sont de minuscules vaisseaux sanguins. L'adventice protège et maintient la structure des vaisseaux sanguins (5-8).

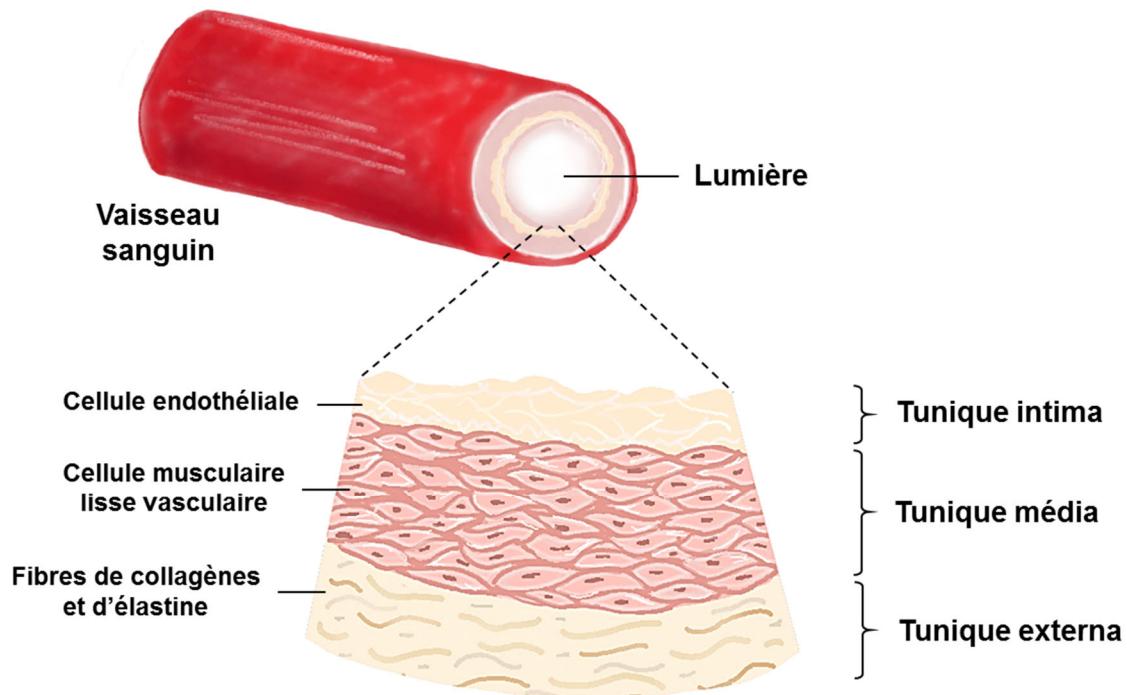


Figure 1. – Les différentes tuniques de la paroi d'un vaisseau sanguin

La paroi vasculaire est composée de trois tuniques. La tunique interne, intima, est composée de cellules endothéliales. La tunique intermédiaire, média, contient des cellules musculaires lisses. La tunique externe, externa, est composée de fibres de collagènes et d'élastine. (Figure adaptée de(5))

Au niveau cellulaire, le remodelage vasculaire s'effectue par un changement de phénotype des CMLVs (**Figure 2**) (9). Ce changement se définit par une dédifférenciation des CMLVs d'un état contractile à un état synthétique. Les cellules contractiles sont fusiformes et allongées, contrairement aux cellules synthétiques qui ont une forme plutôt circulaire et moins allongées (9). Une augmentation de la prolifération, croissance et migration est constatée dans les CMLVs synthétiques (10). Elles possèdent donc une quantité plus élevée d'organelles impliquées dans la synthèse des protéines, contrairement aux CMLVs contractiles qui sont dans un état plutôt quiescent (9,10). Une conséquence importante du changement phénotypique des CMLVs est une diminution du diamètre de la lumière des vaisseaux sanguins étant caractérisée par une augmentation du nombre (hyperplasie) et de la taille (hypertrophie) des cellules ainsi que la production supplémentaire de composantes de la matrice extracellulaire (4,9). Au niveau de la

signalisation cellulaire des CMLVs, ces changements structuraux sont associés à une augmentation des facteurs de croissance, d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), et/ou de l'activité des peptides vasoconstricteurs, tels que l'endothéline (ET-1) et l'angiotensine II (Ang II) (**Figure 2**) (9,11). L'emphasis de ce mémoire portera sur l'Ang II, dont la contribution dans les maladies vasculaires a été fortement explorée (12,13). Cependant, les mécanismes moléculaires précis de l'Ang II contribuant aux MCVs demeurent encore incertains.

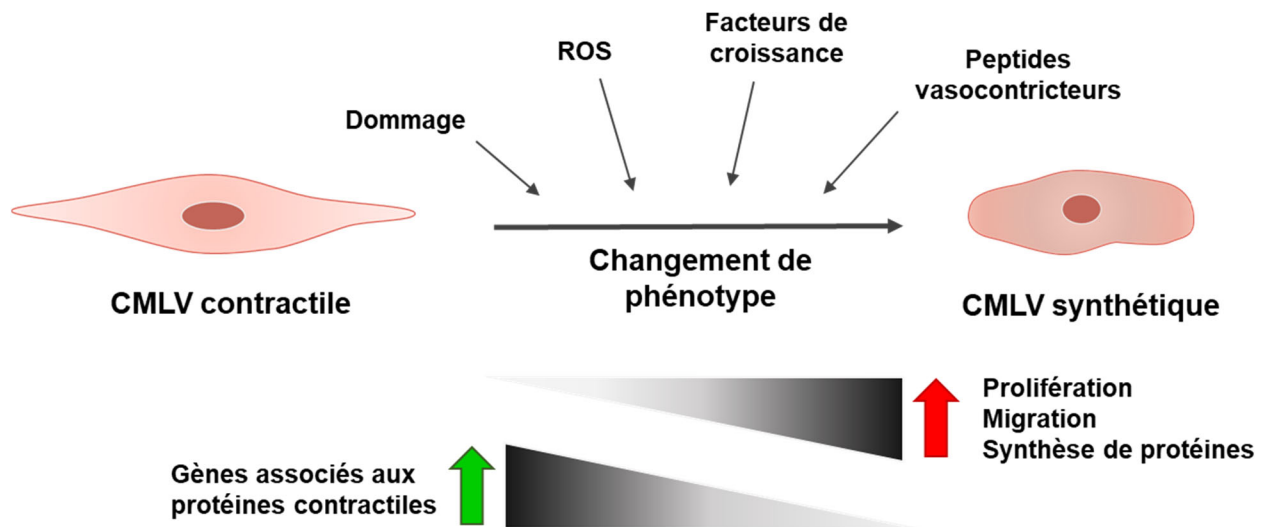


Figure 2. – Le changement de phénotype des cellules musculaires lisses vasculaires

Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) contractiles peuvent se différencier en CMLVs synthétiques suite à des dommages vasculaires, des espèces réactives de l'oxygène (ROS), des facteurs de croissance et/ou des peptides vasoconstricteurs. Les cellules synthétiques sont plus propices à proliférer, migrer et synthétiser des protéines. Les cellules contractiles expriment un niveau plus élevé de gènes associés aux protéines contractiles. (Figure adaptée de (14))

1.1 Historique de l'angiotensine

Vers la fin du XIX^e siècle, Robert Tigerstedt et Per Gunnar Bergman ont découvert un composé presseur dans des tissus rénaux et décident de le nommer rénine (15,16). Dans les années qui suivent, les équipes du Dr Bernardo Houssay et du Dr Irvine H. Page découvrent un nouveau composé, nommé *hypertensin* ou *agiotonin*, produit par l'interaction de la rénine avec une protéine du plasma (16-18). En 1958, ces laboratoires consentent de le nommer angiotensine

(19). Entre temps, l'équipe de Leonard Skegg découvre deux isoformes de l'angiotensine étant l'angiotensine I (Ang I) et l'Ang II (20,21). Depuis ces découvertes, a été élucidée une famille d'angiotensine, telle que l'angiotensinogène, l'angiotensine III (Ang III) et l'angiotensine IV (Ang IV), ainsi que l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) (22-24). À partir des années 1950, l'Ang II est donc devenue une molécule énormément étudiée grâce à son rôle important dans le système rénine-angiotensine (SRA) par sa capacité de réguler la pression sanguine et sa contribution dans le développement des MCVs (25).

1.2 Système rénine-angiotensine (SRA)

Le SRA est le principal producteur d'Ang II. Tout d'abord, l'angiotensinogène (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile) produite par les hépatocytes, des cellules du foie, est la molécule précurseur de tous les peptides angiotensines (**Figure 3**) (26,27). Par la suite, la rénine, une aspartyle protéase produite dans l'appareil juxtaglomérulaire au niveau des reins, clive les 10 acides aminés de l'extrémité N-terminale de l'angiotensinogène afin de former l'Ang I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) (27,28). L'Ang I est ensuite convertie en Ang II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) par une dipeptidyle carboxypeptidase, connue sous le nom d'ECA (29). Par ailleurs, le clivage de l'Ang I en Ang(1-9) est effectué par des carboxypeptidases et la conversion de l'Ang II sous d'autres formes d'angiotensines est réalisée par des aminopeptidases ou carboxypeptidases (12,30).

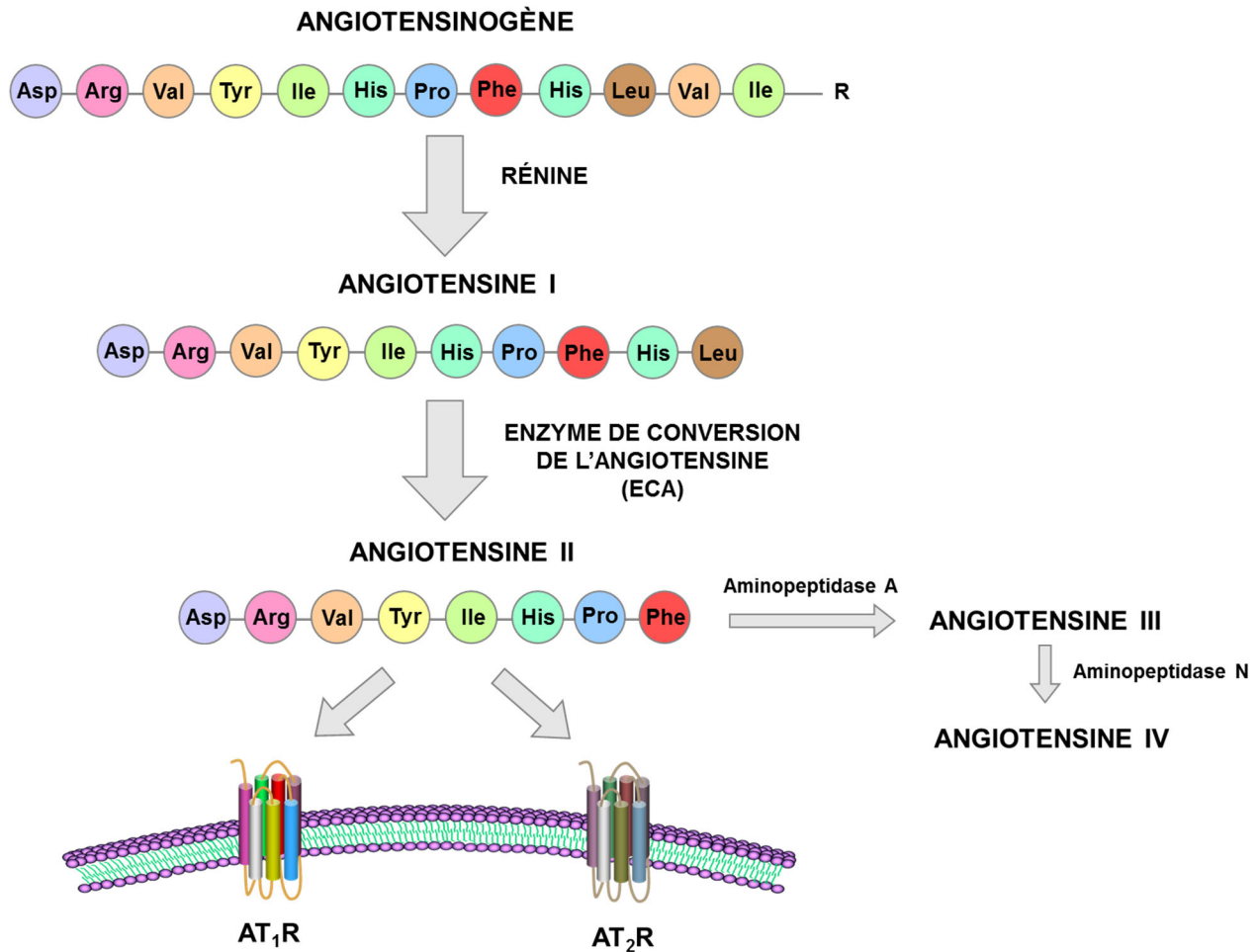


Figure 3. – La voie classique du système rénine-angiotensine

Le substrat angiotensinogène est converti en angiotensine I par l'enzyme rénine. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) permet la formation d'angiotensine II à partir de l'angiotensine I. L'Ang II peut se lier aux récepteurs de l'angiotensine de type 1 (AT₁R) et aux récepteurs de l'angiotensine de type 2 (AT₂R). L'Ang II a la possibilité d'être convertie en angiotensine III et angiotensine IV à l'aide de différentes aminopeptidases. (Figure adaptée de (31))

1.3 Angiotensine II et ses dérivées

Dans des conditions physiologiques, l'Ang II (Ang-(1-8)) est majoritairement synthétisée par l'ECA clivant les deux acides aminés de l'extrémité C-terminale de l'hormone décapeptide Ang I (**Figure 3**) (27,28). L'ECA devient donc une enzyme cruciale dans la régulation de la

concentration de l'Ang II (32-34). À la suite de la formation de l'Ang II, celle-ci peut se lier aux récepteurs de l'angiotensine ou se métaboliser en d'autres formes d'angiotensines, dont la nomenclature est basée sur le nombre restant d'acides aminés. L'Ang II a la possibilité d'être clivée en Ang-(1-7) par la carboxypeptidase ECA de type 2 (35). L'Ang-(1-7) peut se lier aux récepteurs Mas et aux récepteurs *Mas-related G-protein-coupled receptor member D* (MgrD). Cette liaison induit des cascades signalétiques qui s'opposent à l'action vasoconstrictrice de l'Ang II (36-38). De plus, l'Ang II peut être convertie d'abord en Ang III (Ang-(2-8)) par l'aminopeptidase A, puis en Ang IV (Ang-(3-8)) par l'aminopeptidase N (12,35). L'Ang III se lie aux mêmes récepteurs que l'Ang II, alors que l'Ang IV se lie à des récepteurs de l'angiotensine qui induit des effets vasodilatateurs (12,39). Par ailleurs, la conversion d'Ang I en Ang II est effectuée par une voie non dépendante de l'ECA. Des cathepsines G, chymases et enzymes génératrices d'Ang II sensibles à la chymostatine génèrent également de l'Ang II (40-42).

1.4 Régulation de l'angiotensine II

Le rôle principal de l'Ang II est de réguler la pression sanguine et la rétention d'eau (équilibre sodique) au sein d'un organisme (43). La production d'Ang II est donc contrôlée par des changements de pression sanguine. Lorsque la pression sanguine est basse au niveau des reins, la rénine est sécrétée, permettant ainsi la production d'Ang II (43). L'Ang II agit au niveau du cortex de la glande surrénale pour produire de l'aldostérone afin de contrôler le niveau de sel en réabsorbant les ions sodiums et chlorures, en excréant les ions potassiques et en retenant l'eau (31,43). L'Ang II agit notamment sur le tubule distal et le canal collecteur pour réabsorber l'eau par la libération de l'hormone vasopressine produite par l'hypothalamus (44). De plus, l'Ang II agit sur le système cardiovasculaire pour réguler la vasoconstriction, ainsi que sur le système nerveux central pour gérer la soif et la consommation de liquide (45). Toutes ces actions ont comme but d'augmenter la pression sanguine. Une fois rétabli, le niveau de sécrétion de rénine et la concentration d'Ang II diminuent (13).

1.5 Récepteurs de l'angiotensine II et ses dérivés

L'Ang II exerce ses effets en se liant principalement à deux récepteurs qui appartiennent à la superfamille des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR) : les récepteurs

de l'angiotensine de type 1 (AT₁R) et les récepteurs de l'angiotensine type 2 (AT₂R) (**Figure 3**) (12,31,46). La liaison de l'Ang II aux AT₁R et AT₂R enclenche différentes voies de signalisations, dont les effecteurs en aval ont des rôles opposés pour assurer l'équilibre des fonctions.

1.5.1 Récepteurs de l'angiotensine de type 1

Les AT₁R sont omniprésents dans différents organes, tels que les glandes surrénales, les poumons, le cœur, le foie, le cerveau ainsi que le système vasculaire (13,46). L'Ang II se lie principalement aux AT₁R, ce qui mène à des cascades signalétiques associées à la vasoconstriction, la croissance, la migration, l'inflammation et la production de matrice extracellulaire (13). Les voies de signalisations associées au système vasculaire de la liaison de l'Ang II aux AT₁R seront détaillées dans la section 1.6.

1.5.2 Récepteurs de l'angiotensine de type 2

L'Ang II se lie également aux AT₂R qui sont généralement situés dans les tissus fœtaux. Ces récepteurs sont aussi présents dans le cerveau, le cœur, les reins et le système vasculaire (13,40,47). De plus, l'expression des AT₂R diminue après la naissance et augmente de manière importante dans des conditions pathologiques durant la vie adulte. La liaison de l'Ang II aux AT₂R induit des cascades signalétiques qui sont associées à la vasodilatation, l'inhibition de croissance et l'augmentation d'apoptose (46).

L'Ang II se lie aux AT₂R des cellules endothéliales et ceux-ci sont couplés aux protéines G_{αi}. Cette liaison permet la production de monoxyde d'azote (NO) en convertissant la L-arginine en L-citrulline à l'aide de l'*endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) (48,49). L'implication de la bradykinine et de son récepteur contribue également à la production de NO induite par l'Ang II (50,51). Le NO agit ensuite sur les CMLVs et active la guanylate cyclase (GC) afin de convertir la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (cGMP) (48,51). L'augmentation du niveau de la cGMP induit la vasodilatation et diminue la pression sanguine. De plus, le NO a un effet antiprolifératif sur les CMLVs (52,53). Au niveau du système cardiovasculaire, la liaison de l'Ang II aux AT₂R stimule la protéine phosphatase 2A (PP2A) et la *Src homology region 2 domain-containing tyrosine phosphatase* (SHP-1), qui empêche

l'activation des *extracellular signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2), permettant ainsi d'inhiber l'apoptose et l'hypertrophie cellulaire (48,54-57).

1.5.3 Récepteurs de l'angiotensine de type 4

Les récepteurs de l'angiotensine de type 4 (AT₄R) sont principalement présents dans le cerveau, mais ils se retrouvent aussi dans les vaisseaux sanguins, le cœur, les reins et les glandes surrénales (39,58). Dans le système vasculaire, la liaison de l'Ang IV à ses récepteurs a un effet dilatateur en augmentant l'activité de l'eNOS (39,59). Il y a notamment l'activation des voies signalétiques des ERK1/2 et de la *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) qui ont un rôle dans la prolifération des cellules (60).

Les AT₄R sont également connus comme étant des *insulin-regulated aminopeptidases* (IRAP) (39,61). Plusieurs controverses ont été rapportées face à l'existence seule des IRAP comme AT₄R, à cause des réponses physiologiques divergentes induites par l'Ang IV à la suite du blocage des IRAP (58,62,63). D'ailleurs, des études plus récentes montrent la contribution d'autres protéines transmembranaires en réponse à une stimulation avec de l'Ang IV (58,64). Malgré cela, des études plus approfondies seront nécessaires pour mieux caractériser les récepteurs de l'Ang IV et les mécanismes activés dans les maladies vasculaires.

1.5.4 Récepteurs Mas et *Mas-related G-protein-coupled receptor member D*

L'Ang-(1-7), produite par l'ECA de type 2 à partir de l'Ang II, se lie aux récepteurs Mas qui sont situés au niveau du cerveau, du cœur, du système vasculaire et des reins (12,36,65). Cette liaison contribue au remodelage cardiaque, aux altérations vasculaires, aux fonctions rénales, ainsi qu'à l'inflammation (66-69). De plus, l'Ang-(1-7) se lie aux récepteurs MgrD permettant de stimuler la production d'AA et de NO (58,70). Il y a également une production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) par l'activation des récepteurs Mas et MgrD par l'Ang-(1-7) (12,71). Ces mécanismes participent donc à la vasodilatation contrairement aux actions vasoconstrictrices de la liaison de l'Ang II aux AT₁R.

1.6 Angiotensine II et ses cascades signalétiques dans le système vasculaire

1.6.1 Cascades signalétiques couplées aux protéines G

L'Ang II se lie aux AT₁R des CMLVs et ces récepteurs sont couplés au complexe de protéines G_{αq/11}, G_{α12/13} et G_{βγ} (72,73). Cette liaison entraîne l'activation de plusieurs effecteurs en aval, tels que la phospholipase C (PLC), phospholipase A₂ (PLA₂) et phospholipase D (PLD), tous des contributeurs à la vasoconstriction (**Figure 4**) (74-76).

La liaison de l'Ang II aux AT₁R active la PLC. Cette phospholipase induit rapidement la formation de l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) et du diacylglycérol (DAG) par l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) situé à la membrane plasmique (74). L'IP₃ se lie par la suite à son récepteur localisé sur le réticulum sarcoplasmique. Cette action permet l'ouverture du canal qui fait entrer le calcium (Ca²⁺) dans le cytoplasme, augmentant la concentration du Ca²⁺ intracellulaire. Ce Ca²⁺ se lie à la calmoduline (CaM) et induit l'activation de la *myosin light chain kinase* (MLCK) (77). La MLCK phosphoryle la chaîne légère de la myosine, ce qui facilite la liaison de l'actine à la myosine, jouant alors un rôle important dans la contraction des CMLVs. Pour contrecarrer l'activité des MLCK, les CMLVs possèdent des *myosin light chain phosphatases* (MLCP) qui déphosphorylent les chaînes légères des myosines, permettant ainsi la relaxation de ces cellules (78). De plus, le DAG active la protéine kinase C (PKC) qui régule les canaux et pompes à ions à des fins de contraction vasculaire (79).

L'interaction entre l'Ang II et les AT₁R active la PLA₂, une autre phospholipase, qui transforme la phosphatidylcholine (PC) en acide arachidonique (AA) (75). D'une part, l'AA est métabolisé en acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs) et acides époxyéicosatriénoïques (EETs) par le cytochrome P450. Les HETEs contribuent à la contraction des CMLVs en facilitant l'entrée de Ca²⁺, contrairement aux EETs qui participent à leur relaxation (80). D'autre part, l'AA est métabolisé en prostaglandine (PG) E₂ (PGE₂) et PGI₂ qui ont un effet vasodilatateur (81). L'AA permet aussi la formation de la PGH₂ et thromboxane A₂ (TxA₂) qui sont des vasoconstricteurs par la cyclooxygénase (COX) (81). L'AA produit en outre des leucotriènes (LTs) ayant un rôle vasoconstricteur et inflammatoire par la lipooxygénase (LO) (81). Les métabolites de l'AA

affectent également le niveau de stress oxydatif des cellules en régulant l'activité de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase NADPH/NADH (82).

La liaison de l'Ang II aux AT₁R induit notamment l'activation de la PLD. Cette phospholipase hydrolyse la PC en choline et en acide phosphatidique (PA) (76). PA est par la suite converti en DAG, ce qui permet l'activation de la PKC et contribue à la contraction des CMLVs (13).

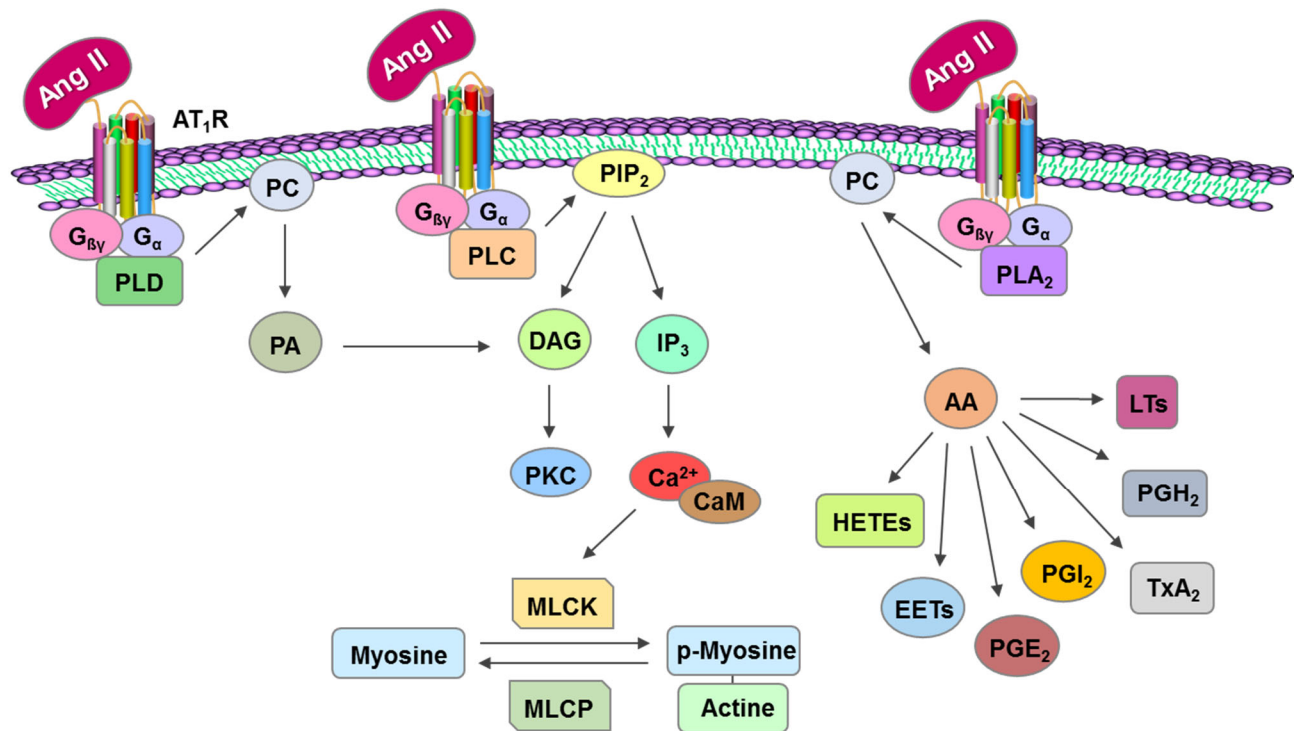


Figure 4. – Les cascades signalétiques de l'angiotensine II couplée aux protéines G du récepteur de l'angiotensine de type 1 dans les cellules musculaires lisses vasculaires

L'Ang II se lie aux AT₁R couplés au complexe de protéines G_α et G_{βγ} et induit l'activation de différentes phospholipases, telles que la phospholipase D (PLD), phospholipase C (PLC) et phospholipase A₂ (PLA₂). (Figure adaptée de (13))

1.6.2 Cascades signalétiques des *mitogen-activated protein kinases*

L'Ang II couplée aux AT₁R enclenche de plus des voies de signalisation associées à la prolifération, la survie, la migration et l'hypertrophie des CMLVs, telles que les voies *mitogen-activated protein kinases* (MAPK). Les voies des MAPK sont composées des ERK1/2, *c-Jun N*-

terminal kinases (JNK) et p38MAPK (**Figure 5**) (13,83,84). La voie des ERK1/2 induite par l'Ang II est la plus étudiée et détaillée parmi les voies des MAPK.

L'activation de la voie des ERK1/2 est induite rapidement après la liaison de l'Ang II aux AT₁R et cette activation est atténuée lors de l'inhibition de la PLC (85). La kinase Src et la protéine kinase tyrosine 2 (Pyk2) induisent la phosphorylation du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et ceci permet la formation du complexe *Src homology 2 domain/growth factor receptor-bound protein 2/son of the sevenless* (Shc/Grb2/Sos) (13). Ce complexe active la kinase Raf, puis celle-ci phosphoryle la MAPK/ERK (MEK) à l'aide de la protéine Ras et PKC (86,87). L'activation de la MEK induit la phosphorylation de l'ERK1/2, enclenchant alors l'activation des gènes associés à la prolifération, migration, différenciation cellulaires et synthèse de protéines (88,89).

De plus, l'Ang II induit l'activation des voies des JNK et p38MAPK par le signal d'apoptose régulant la kinase 1 (ASK1). L'ASK1 phosphoryle MEK4 et MEK7 pour activer JNK. L'ASK1 phosphoryle aussi MEK3 et MEK6 pour activer p38MAPK (90). La phosphorylation de JNK et p38MAPK induisent des cascades signalétiques associées à la survie, la différenciation, l'apoptose et l'inflammation vasculaire (40). L'activation des voies JNK et p38MAPK par l'Ang II peut aussi inclure la kinase Rho, la protéine Rac et les ROS (91,92).

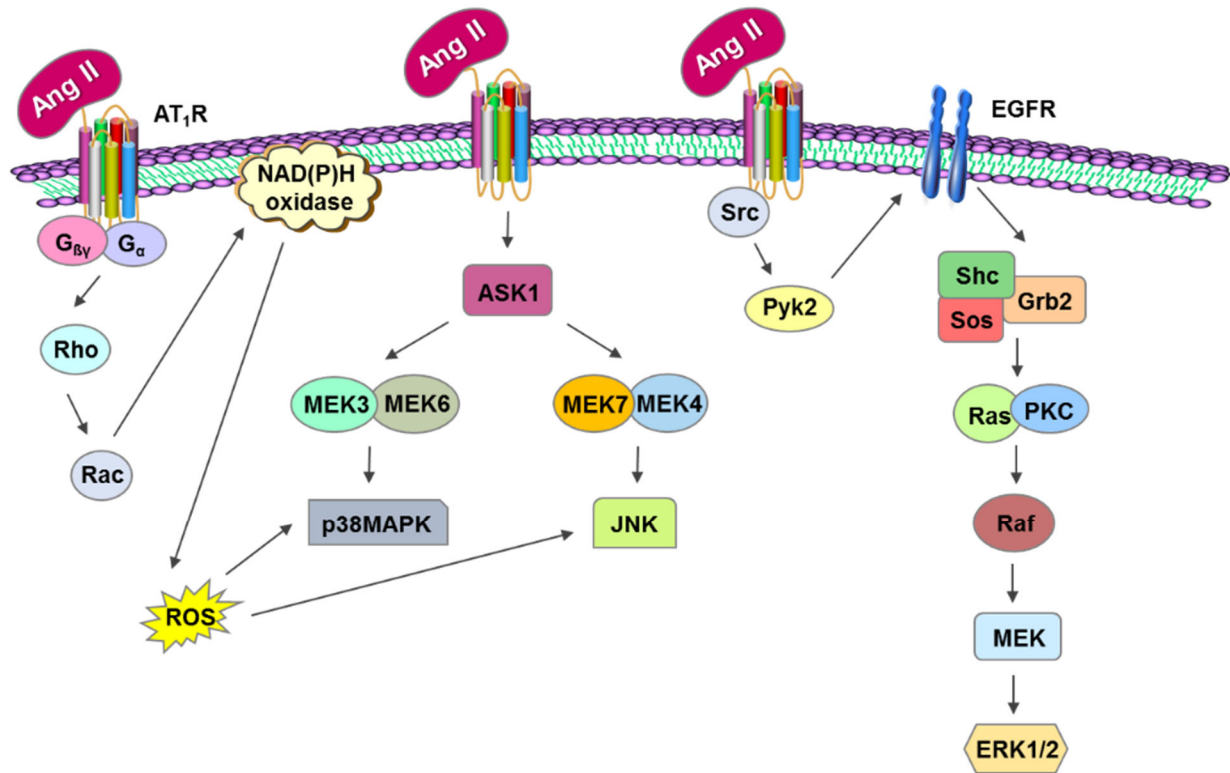


Figure 5. – Les cascades signalétiques des *mitogen-activated protein kinases* induites par l'angiotensine II dans les cellules musculaires lisses vasculaires

L'Ang II se lie aux AT₁R et induit l'activation la voie des MAPK qui est composée des *extracellular signal-regulated kinases* 1/2 (ERK1/2), *c-Jun N-terminal kinases* (JNK) et p38MAPK. (Figure adaptée de (13))

1.6.3 Cascades signalétiques de la *phosphatidylinositol 3-kinase*

L'Ang II induit l'activation de la PI3K par sa liaison aux AT₁R et par la transactivation du récepteur EGFR dans les CMLVs (**Figure 6**) (40,93). Les voies signalétiques induites par la PI3K contribuent à l'augmentation de synthèse de protéines reliée à la prolifération, la survie et l'hypertrophie cellulaires (13,40).

La liaison de l'Ang II aux AT₁R induit une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ par la PLC. Une élévation de Ca²⁺ et une production de ROS permettent la transactivation de l'EGFR à l'aide de l'*A disintegrin and metalloproteinase* (ADAM) (94,95). Une fois que l'EGFR

est activé, le complexe Shc/Grb2/Sos se forme. Ce complexe active la protéine Ras qui induit non seulement la voie des ERK1/2, mais aussi l'activation de la PI3K. La PI3K active la 3-*phosphoinositide dependent protein kinase-1* (PDK1) qui phosphoryle la protéine kinase B (PKB/Akt) (40).

La kinase Akt est l'effecteur en aval le plus crucial de la voie PI3K. La famille d'Akt est composée de trois isoformes, Akt1, Akt2 et Akt3, qui diffèrent par leur localisation et leur fonction cellulaire. L'Akt joue un rôle dans le métabolisme, la prolifération, la survie, la translation et l'angiogenèse. En effet, cette kinase régule de nombreux effecteurs, tels que la *glycogen synthase kinase 3* (GSK3), le *mammalian target of rapamycin complex* (mTOR), la *cAMP response element-binding protein* (CREB), l'*endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) et l'ASK1 (96). L'Akt1 est la forme la plus impliquée dans les MCVs en contribuant à la progression de l'athérosclérose, l'angiogenèse et l'inflammation (96-99). Par ailleurs, les souris déficientes en kinases Akt1 (Akt1^{-/-}) sont plus propices à développer l'hypertrophie cardiaque comparé aux souris *wild-type* (WT) (96). Des CMLs transfectées avec une forme dominante négative de la kinase Akt ont une réduction de la prolifération et de la synthèse d'acide désoxyribonucléique (ADN) (100). De plus, une augmentation de la phosphorylation d'Akt est constatée chez les rats spontanément hypertendus (SHR), un modèle d'animaux pour étudier l'hypertension, comparé aux rats normotendus Kyoto-Wistar (WKY) (101,102). L'inhibition pharmacologique de la PI3K a diminué la prolifération cellulaire chez des rats SHRs (101). L'activation de la kinase Akt est donc fortement explorée, particulièrement dans les MCVs, et une meilleure compréhension de ses partenaires d'interactions et ses effecteurs en aval aiderait à découvrir des cibles potentielles à des fins thérapeutiques.

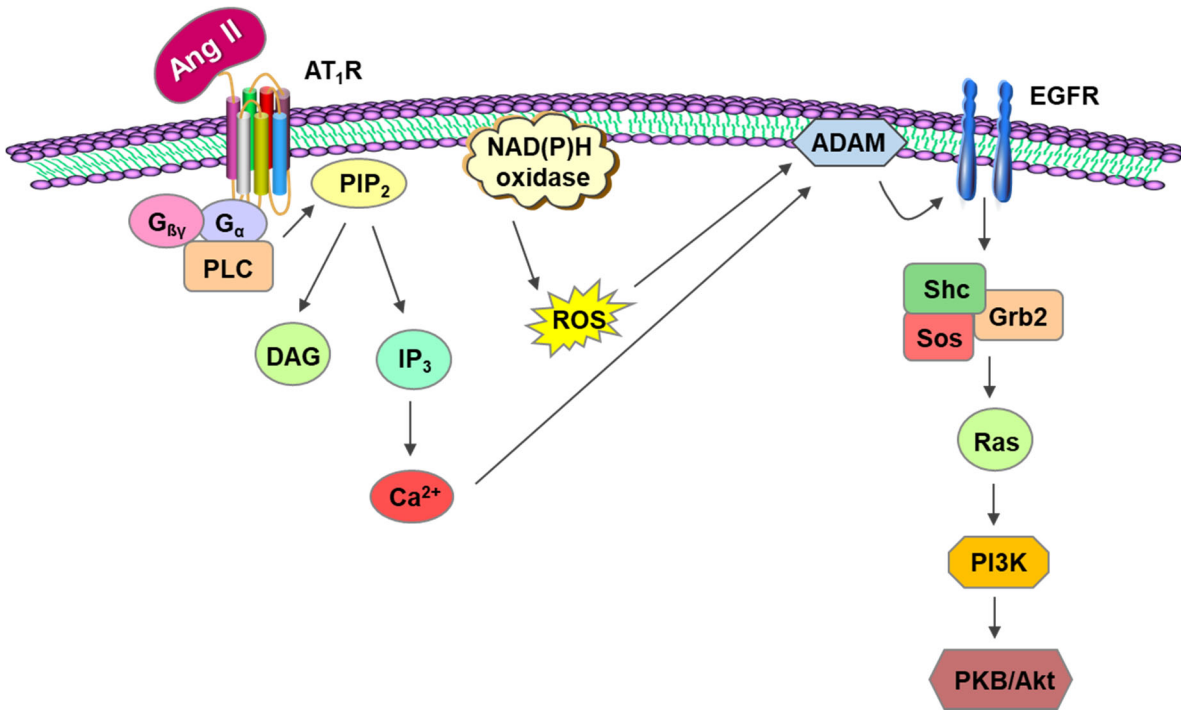


Figure 6. – La cascade signalétique de la *phosphatidylinositol 3-kinase* induite par l'angiotensine II dans les cellules musculaires lisses vasculaires

L'Ang II se lie aux AT₁R et induit la transactivation du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), puis l'activation de la voie *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K). (Figure adaptée de (40))

1.6.4 Cascade signalétique de l'oxydase NADPH/NADH

La voie oxydase NADPH/NADH induite par l'Ang II permet la production de ROS, telles que les superoxydes et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (**Figures 5 et 6**) (13,82,103). La liaison de l'Ang II aux AT₁R active la PKC à l'aide de la PLC, PLD et PLA₂ (104-106). Cette kinase stimule la protéine p47phox, une sous-unité cruciale de l'oxydase NADPH/NADH (103,107,108). L'activation de cette oxydase transforme alors l'oxygène (O₂) en anion superoxyde ($\cdot\text{O}_2^-$). Par la suite, l' $\cdot\text{O}_2^-$ est converti en O₂ et H₂O₂ par des superoxydes dimutases (SOD). L' $\cdot\text{O}_2^-$ et le H₂O₂ contribuent à l'inflammation, l'activation de différentes cascades signalétiques, ainsi qu'à l'augmentation de gènes associés à la croissance cellulaire (82,109,110). En outre, des augmentations de l'activité de l'oxydase NADPH/NADH et de la production d' $\cdot\text{O}_2^-$ sont remarquées chez les rats SHR comparée aux rats WKY (102).

1.7 Angiotensine II et ses effets pathophysiologiques sur le système vasculaire

La concentration de l'Ang II est supérieure dans les MCVs, particulièrement l'hypertension et l'athérosclérose (12,111,112). La découverte des inhibiteurs de l'Ang II et de ses récepteurs ont eu plusieurs effets bénéfiques sur le système vasculaire (32-34,113,114).

1.7.1 Hypertension

L'hypertension est une condition associée à une élévation persistante de la pression sanguine, accroissant le risque de développer des MCVs et de subir un arrêt cardiaque (25). En effet, l'augmentation graduelle et à long terme de la pression artérielle cause des dommages aux vaisseaux sanguins entraînant un remodelage vasculaire. L'épaisseur de la tunique média augmente et le diamètre de la lumière diminue, ayant comme conséquence d'augmenter la résistance périphérique (111,115,116).

De nombreuses études ont démontré que des souris perfusées avec de l'Ang II ont des pressions systolique et diastolique plus élevées (117,118). Une augmentation de la concentration de l'Ang II a été remarquée chez des rats SHR comparée aux rats WKY (119-121). Une stimulation chronique de l'Ang II induit également une hyperplasie et une hypertrophie des CMLVs, deux signes étroitement liés à la progression de l'hypertension (13,111,122). Ces constatations ont été confirmées dans des modèles animaux hypertendus (123,124).

Pour prévenir l'hypertension et les changements vasculaires causés par cette condition, des inhibiteurs de l'ECA et des AT₁R sont administrés (125-130). Les inhibiteurs de l'ECA, tels que le périndopril, le captopril et l'énalapril, ont diminué la prolifération, l'hypertrophie cellulaires et la pression sanguine chez des rats SHR (126-128,131). D'ailleurs, les inhibiteurs de l'ECA sont des traitements couramment utilisés chez les patients atteints d'hypertension (32,132). Des études cliniques ont montré que l'efficacité du captopril et de l'énalapril a diminué la pression artérielle systolique (32,133,134). De plus, l'inhibition des AT₁R empêche les signes associés à l'hypertension. Des rats SHR traités avec un antagoniste des AT₁R ont exhibé des réductions de

la pression artérielle systolique, du ratio média/lumière et de l'épaisseur de la paroi des vaisseaux sanguins, comparés aux rats SHR non traités (131).

1.7.2 Athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie qui touche la paroi des artères par la formation de plaques athéromateuses (135). Elles sont formées par une accumulation de dépôt de cholestérol sur la paroi interne. La production de fibroblastes et le dépôt calcique provoquent le durcissement de ces plaques. Il y a donc un encombrement de la circulation sanguine qui est dû au rétrécissement de la lumière du vaisseau sanguin (135). Plusieurs études cliniques ont démontré l'implication de l'Ang II dans le développement de l'athérosclérose par sa contribution dans le dysfonctionnement endothélial, le stress oxydatif, l'inflammation, la déstabilisation des plaques, ainsi que la thrombose (136,137). Les mécanismes moléculaires et cellulaires précis impliquant l'Ang II sur la progression de l'athérosclérose demeurent encore peu clairs.

L'importance des AT₁R dans le développement de l'athérosclérose est constatée dans différents modèles animaux (112-114,138). Des souris déficientes en apolipoprotéines E (ApoE^{-/-}), suivant une diète riche en cholestérol, ont développé des lésions athérosclérotiques sévères et un niveau de stress oxydatif supérieur comparées aux souris WT (114). Par contre, les souris ApoE^{-/-} et déficientes en AT₁R (ApoE^{-/-}-AT₁R^{-/-}) sous la même diète ont été protégées de la formation des lésions athérosclérotiques, ainsi que du dysfonctionnement endothélial (114). L'inhibition pharmacologique des AT₁R chez les souris ApoE^{-/-} a donc amélioré les lésions athérosclérotiques et les fonctions vasculaires (114).

Une augmentation de la liaison de l'Ang II à ses récepteurs cause une suractivation des voies signalétiques impliquées dans la transcription de gènes associés au remodelage vasculaire (40,101,102,111). Il est donc important d'investiguer rigoureusement les cascades et les effets pathophysiologiques associés à la dérégulation de l'Ang II.

2.1 *Early growth response protein-1 (Egr-1)*

Tel que mentionné précédemment, la liaison de l'Ang II à ses récepteurs induit plusieurs voies de signalisations. L'Ang II a donc le potentiel d'activer des facteurs de transcription qui synthétisent des protéines liées à la croissance, la prolifération, la migration et l'hypertrophie cellulaires (13,40). L'Ang II est un puissant activateur de l'*early growth response protein-1* (Egr-1), un facteur de transcription à doigt de zinc, dont l'expression est peu détectable dans des CMLVs quiescentes (139-142).

2.2 Structure et régulation de l'*early growth response protein-1*

Vers les années 1987, plusieurs recherches ont été effectuées dans le but de trouver de nouveaux facteurs de croissance, résultant alors à la découverte de l'Egr-1. La protéine Egr-1 est aussi connue sous d'autres noms, tels que le *nerve growth factor induced-A* (NGFI-A) (143), ZIF268 (144), TIS8 (145) et krox-24 (146). Le domaine de liaison à l'ADN de l'Egr-1 est constitué de trois doigts de zinc formés d'un motif structural répétitif de Cys₂-His₂ (147,148). Cette région possède aussi le signal de localisation nucléaire (NLS) du côté N-terminal (148). Un puissant domaine d'activation est localisé à l'extrémité N-terminale et un faible domaine d'activation est situé à l'extrémité C-terminale de l'Egr-1. L'Egr-1 contient un domaine répresseur permettant la liaison des corépresseurs comme les *nerve growth factor induced-A-binding proteins 1* et *2* (149,150). Par ailleurs, des coactivateurs comme *CREB-binding protein* et p300 peuvent se lier directement sur la région activatrice de l'Egr-1 (151).

Des facteurs de croissance, peptides vasoconstricteurs, tensions ou blessures vasculaires, ainsi que le stress oxydatif ont la capacité d'induire l'expression de l'Egr-1 (140-142,152-160). L'Egr-1 se lie préférentiellement à des séquences riches en guanines et cystéines de l'ADN et modifie la transcription de gènes selon la présence des coactivateurs et corépresseurs (153). De plus, l'Egr-1 a un rôle dans la prolifération, la croissance, la transduction de signal cellulaire et la guérison des plaies (cicatrisation) (139,161,162).

2.3 Cascades signalétiques induisant l'expression de l'*early growth response protein-1* dans les cellules musculaires lisses

De multiples stimuli et voies de signalisations entraînent l'activation du facteur de transcription Egr-1 (**Figure 7**). Notre laboratoire a démontré la contribution des peptides vasoconstricteurs, tels que l'Ang II et l'ET-1, et l'hormone *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) dans l'expression de l'Egr-1 dans les CMLVs (140-142,157-160). Cette expression est inhibée par la curcumine, un composé naturel ayant des propriétés protectrices envers les MCVs (157,159,163). De plus, la concentration de Ca^{2+} et les protéines de liaison du calcium jouent un rôle important dans l'induction de l'expression de l'Egr-1 (142,158). En effet, le blocage de la *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II* (CaMKII), *stromal interaction molecule 1* (STIM-1) ou *calcium release-activated calcium channel protein 1* (ORAI-1) a diminué l'expression de l'Egr-1 dans les CMLVs (142,158).

La cascade des MAPK, incluant ERK1/2, JNK et p38MAPK, est rapportée de moduler l'expression de l'Egr-1 (142,164,165). Des inhibiteurs pharmacologiques de l'ERK1/2 ou JNK ont atténué l'expression de l'Egr-1 dans les CMLs stimulées par l'acide lysophosphatidique (164). Le blocage de l'ERK1/2 ou de la p38MAPK a aussi diminué l'expression de l'Egr-1 induite par l'insuline dans les CMLVs (165). De plus, des ROS, tels que le H_2O_2 , sont impliquées dans l'induction de l'expression de l'Egr-1 dans les CMLVs (155,165). L'inhibition des composantes des MAPK a réduit l'expression de l'Egr-1 induite par le H_2O_2 (165). Par ailleurs, la cascade signalétique de la PI3K/Akt est impliquée dans l'expression de l'Egr-1 induite par l'IGF-1 ou le H_2O_2 (155,159). Cependant, la contribution de cette voie dans l'expression de l'Egr-1 suite à une stimulation de l'Ang II n'est toujours pas explorée.

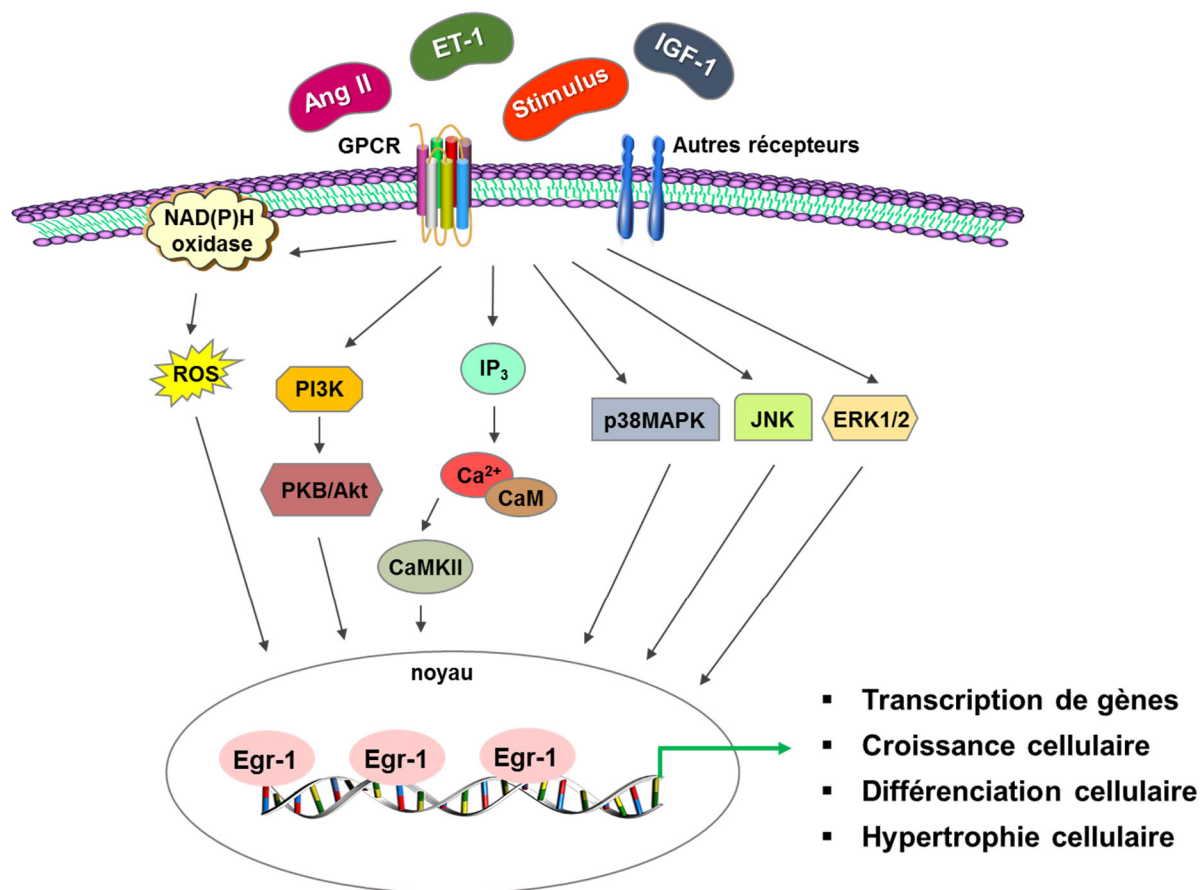


Figure 7. – Les cascades signalétiques induisant l’expression de l’*early growth response protein-1* dans les cellules musculaires lisses

Divers stimuli induisent l’expression de l’*early growth response protein-1* (Egr-1) par différentes voies de signalisations dans les CMLVs. L’activation de l’Egr-1 induit la transcription de gènes, la croissance, la différenciation et l’hypertrophie cellulaire. (Figure adaptée de (140))

2.4 *Early growth response protein-1* et les maladies cardiovasculaires

Dans les pathologies cardiovasculaires, une élévation de l’expression de l’Egr-1 est détectée (156,161). Cette augmentation est aussi associée au développement néointimal (139,156). Dans les lésions des patients atteints de l’athérosclérose carotidienne obstructive, le niveau d’expression de l’acide ribonucléique messager (ARNm) de l’Egr-1 est cinq fois plus élevé que dans des régions vasculaires non athérosclérotiques (161). Une augmentation de l’expression de l’Egr-1 est aussi observée dans les CMLs adjacentes aux lésions athérosclérotiques chez un modèle de souris transgénique de l’athérosclérose (161). La dégradation de l’ARNm de l’Egr-1

résulte en une diminution de la prolifération et migration des cellules vasculaires. Cette dégradation réduit également l'hyperplasie de l'intima dans un modèle murin (166). De plus, des cellules extraites de l'aorte des souris ApoE^{-/-} expriment un niveau d'expression d'Egr-1 significativement plus élevé comparé aux souris WT (167). Harja et ses collègues ont développé une souris transgénique ApoE^{-/-} et Egr-1^{-/-} (ApoE^{-/-}-Egr-1^{-/-}) dans le but d'étudier l'impact de la délétion de l'Egr-1 sur la progression de l'athérosclérose. Ces souris avec le double knockout ont des lésions athérosclérotiques moins étendues et moins complexes comparées aux souris ApoE^{-/-}. Une diminution de la présence des facteurs pro-inflammatoires a aussi été constatée chez les souris ApoE^{-/-}-Egr-1^{-/-} (167). Collectivement, l'activation de l'Egr-1 joue un rôle critique dans la progression des lésions athérosclérotiques et une amélioration de cette pathologie est observée lorsque le gène est supprimé (166,167).

L'Egr-1 contribue également au développement de la sténose aortique calcifiée caractérisée par un remodelage fibro-calcique des valvules aortiques qui obstrue graduellement le flux cardiaque (168). Une suractivation de l'Egr-1 est détectée dans les cuspides calcifiées de la valve aortique comparée aux cuspides normales chez les humains (168). La protéine Egr-1 est aussi impliquée dans l'hypertrophie et l'hyperplasie cardiaque (139,169). L'utilisation d'un oligonucléotide antisens d'Egr-1 a inhibé la croissance des cardiomyocytes adultes dans un modèle expérimental murin (169). De plus, des souris ayant reçu des allogreffes cardiaques traitées avec des oligonucléotides antisens d'Egr-1 ont montré une diminution de l'épaisseur de la tunique intima des artères coronaires (170).

Plusieurs études ont rapporté la contribution cruciale de l'Egr-1 dans le développement et la progression des MCVs (167,169,170). Diverses cascades de signalisation, telles que les voies des MAPK et de la PI3K/Akt, induisent l'expression du facteur de transcription Egr-1. La régulation de la transcription de gènes est aussi contrôlée par la modification du statut d'acétylation des histones qui est catalysée par des histones acétylases et histones désacétylases (171-173). Il est donc pertinent d'investiguer l'implication de la modification des histones dans la régulation de l'Egr-1.

3.1 Modifications des histones

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN est condensé sous forme de chromatine et celle-ci est enroulée autour des octamères d'histones (171). L'état de la structure de la chromatine joue alors un rôle critique sur l'activation et la répression de la transcription de nombreux gènes. La modification post-traductionnelle la plus commune de la chromatine est l'acétylation réversible de l'extrémité N-terminale des histones (174). Les histones hyper-acétylées sont retrouvées dans des régions actives en transcription, contrairement aux histones hypo-acétylées qui sont situées dans les régions non actives en transcription (171).

3.2 Histones acétylases et histones désacétylases

La régulation épigénétique de l'expression de divers gènes est contrôlée par des histones acétylases (HATs) et histones désacétylases (HDACs) (171). Les HATs ajoutent des groupements acétyles aux acides aminés lysines sur des histones et protéines non-histones (172). L'acétylation de ces résidus permet une neutralisation des charges, rendant la structure de la chromatine dans un état moins condensé (relaxe). Ce changement de structure permet la transcription de divers gènes par l'attachement des cofacteurs et de l'ARN polymérase II à l'ADN (172,173). Pour balancer l'activité des HATs, les HDACs sont des enzymes qui enlèvent ces groupements acétyles sur les lysines au sein des histones et des protéines non-histones (173,175). La désacétylation de ces résidus condense la chromatine et empêche la transcription des gènes cibles (175). La régulation des HATs et HDACs est donc cruciale pour activer ou réprimer la transcription de gènes.

3.3 Famille des HDACs

18 HDACs ont été identifiées chez l'humain et celles-ci sont regroupées en quatre classes selon leurs similarités de fonction, de structure et d'homologie aux HDACs de levure (**Figure 8**) (176-178). La classe I regroupe les HDAC1, HDAC2, HDAC3, et HDAC8. La classe II est composée des HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 et HDAC10. De plus, cette classe est divisée en deux sous-groupes selon leur fonction et leur localisation cellulaire : la classe IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 et HDAC9) et la classe IIb (HDAC6 et HDAC10) (176,179). La classe III regroupe les *sirtuins*

(SIRT), SIRT 1 à 7. La classe IV est formée des HDAC11. Les HDACs sont aussi réparties en deux grandes familles. Les classes I, II et IV font partie de la grande famille des protéines arginases/désacétylases (HDACs classiques) et requièrent un ion zinc (Zn^{2+}) pour leur activité enzymatique (176,180,181). La classe III est réunie dans la grande famille des *deoxyhypusine synthases* et nécessite l'implication du cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) (176,178).

3.3.1 Classe I

La classe I des HDACs a une similarité de séquence avec la protéine *reduced potassium deficiency 3* provenant de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (**Figure 8**) (176,182). La distribution de la classe I des HDACs est omniprésente dans les tissus et est localisée majoritairement dans le noyau des cellules. Toutefois, plusieurs études démontrent la possibilité de leur localisation dans le cytoplasme et/ou les organites cellulaires spécialisés (183,184). Cette classe joue un rôle central dans l'activité catalytique des complexes multiprotéiques en réprimant la transcription de gènes associés à la progression de l'athérosclérose (185).

3.3.2 Classe II

La classe II des HDACs est homologue à la protéine *histone deacetylase 1* de la levure *S. cerevisiae* (**Figure 8**) (182,186,187). La classe IIa a un domaine catalytique C-terminal très conservé et la classe IIb a deux domaines désacétylases (176). La classe II des HDACs est localisée dans des tissus spécifiques. La classe IIa des HDACs est principalement retrouvée dans le cerveau, le cœur et les muscles squelettiques où leurs fonctions sont exercées (176). Les HDAC6 sont exprimées surtout dans les testicules tandis que les HDAC10 sont trouvées au niveau du foie, des reins et de la rate (188-192).

3.3.3 Classe III

La classe III des HDACs a une similarité de séquence avec la protéine *silent information regulator 2* de la levure (**Figure 8**) (176,178). Cette classe diffère en fonction et en structure des classes I, II, IV des HDACs, puisqu'elle requiert la liaison du NAD^+ au sein de leur domaine catalytique

(176,178,193). Ces HDACs se situent dans différents compartiments de la cellule (194). Les SIRT1, SIRT6 et SIRT7 sont situés dans le noyau, contrairement aux SIRT2 qui sont localisées dans le cytoplasme, alors que les SIRT3, SIRT4 et SIRT5 sont situés dans les mitochondries (194). La régulation de l'activation des *sirtuins* est importante dans les MCVs. Winnik et al. résument concisément leur effet protecteur (195).

3.3.4 Classe IV

La classe IV des HDACs partage plusieurs similarités au niveau de leur domaine catalytique avec les classes I et II des HDACs (**Figure 8**) (176,196). Les HDAC11 semblent avoir des fonctions dans le système immunitaire, le système nerveux, le développement des cancers, ainsi que dans le métabolisme des lipides (197-201). Un niveau élevé des HDAC11 est observé dans des lésions athérosclérotiques (202), mais leur rôle dans les MCVs n'est pas complètement élucidé.

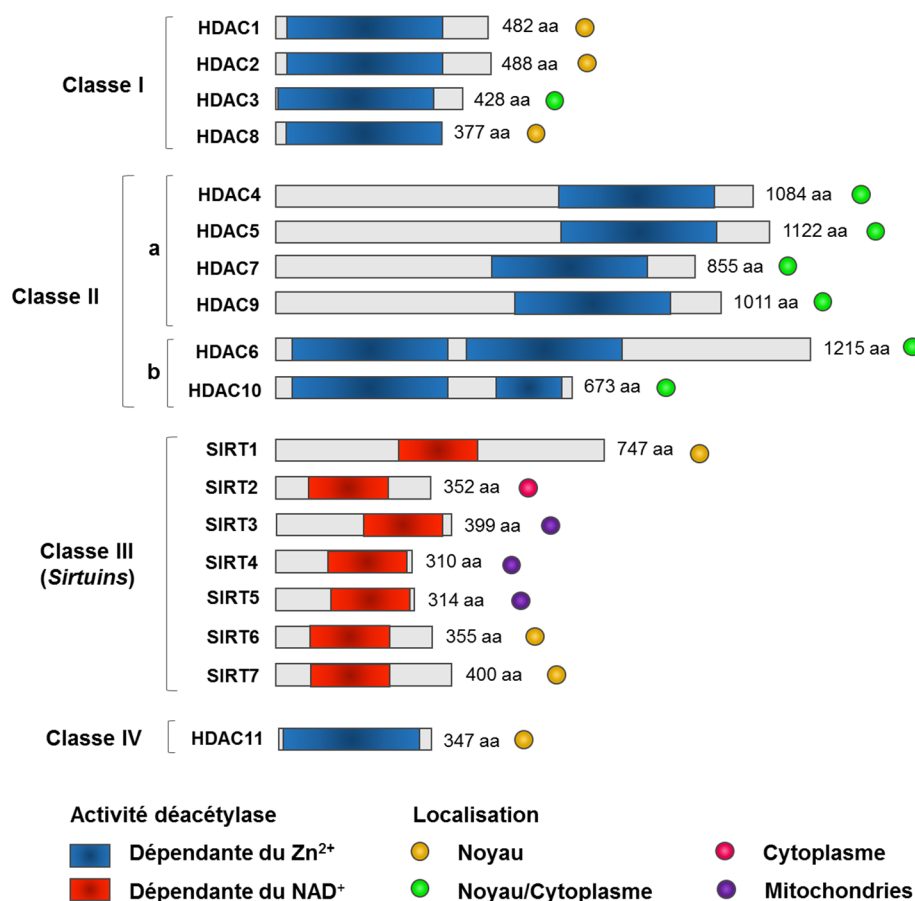


Figure 8. – Les 18 histones désacétylases de l'humain

(Figure adaptée de (176))

3.4 Classe IIa des HDACs (HDAC4, HDAC5, HDAC7 et HDAC9)

Vu l'importance de la classe IIa des HDACs dans les pathologies cardiovasculaires (187,203), le centre d'intérêt de ce mémoire portera sur ces HDACs, en particulier les HDAC4 et HDAC5. L'activité de la classe IIa des HDACs est régulée par leur expression dans des tissus spécifiques, leur interaction avec différents cofacteurs, ainsi que leur export et import nucléocytoplasmique selon leur statut de phosphorylation (*phosphorylation-dependent nucleocytoplasmic shuttling*) (187,192,204).

3.4.1 Structure et partenaires d'interaction de la classe IIa des HDACs

La classe IIa des HDACs possède un large domaine catalytique C-terminal (≈ 400 -450 acides aminés) et un large domaine terminal NH₂ (≈ 450 -600 acides aminés) contenant des résidus sérines très conservés (**Figure 9**) (203,205,206). L'activation de cette classe est déterminée par la phosphorylation de ces sérines (203). Ces HDACs possèdent un NLS dans la région N-terminale et un signal d'export nucléaire (NES) dans la région C-terminale (207,208).

La classe IIa des HDACs a plusieurs partenaires d'interaction, tels que les protéines chaperonnes 14-3-3, le *myocyte enhancer factor 2* (MEF2), l'*E1A C-terminal binding protein* (CtBP), le *silencing mediator for retinoid and thyroid receptor* (SMRT) et le *nuclear receptor co-repressor* (N-Cor) (187,192,207,209-212). La liaison des protéines 14-3-3 aux HDACs est importante pour leur *nucleocytoplasmic shuttling* (210,211). La liaison de MEF2, un membre de la famille des facteurs de transcription *MADS-box*, dans le domaine de liaison des HDACs entraîne la transcription de gènes associés à un remodelage vasculaire (209). La liaison de la CtBP aux HDACs réprime la transcription (212). De plus, la classe IIa des HDACs s'associe avec les corépresseurs SMRT et N-Cor du côté C-terminal, et ce complexe joue un rôle crucial dans l'activité enzymatique de ces enzymes (192,213).

3.4.2 Activité catalytique de la classe IIa des HDACs

La classe IIa des HDACs a un faible potentiel à désacétyler des histones et protéines non-histones comparée aux classes I et IIb des HDACs (176,203,214). Cette faible activité enzymatique est causée par la substitution d'un acide aminé au niveau du site actif de la classe

Ila des HDACs. En effet, la tyrosine située au site actif, un résidu qui stabilise l'intermédiaire de transition lors d'une réaction de substitution d'acyle, est remplacée par une histidine (214). La substitution de l'histidine par une tyrosine a permis de restaurer complètement l'activité désacétylase de la classe IIa des HDACs (214). L'activité enzymatique de la classe IIa des HDACs est donc basée sur le recrutement de la classe I des HDACs, particulièrement les HDAC3, qui possèdent une activité désacétylase puissante avec l'aide du complexe SMRT–N-Cor (186,211,213).

3.4.3 Sites de phosphorylation des HDAC4 et HDAC5

L'état de phosphorylation des résidus sérines (S) contrôlé par diverses kinases et phosphatases est crucial pour réguler l'activité des HDAC4 et HDAC5 (**Figure 9**). Pour les HDAC4, les sites de phosphorylation des sérines sont S246, S467 et S632 (215,216). Quant aux HDAC5, la phosphorylation est effectuée sur les S256, S279 et S498 (203,216).

3.4.4 Navette nucléocytoplasmique (*nucleocytoplasmic shuttling*) des HDAC4 et HDAC5

Le *nucleocytoplasmic shuttling* des HDAC4 et HDAC5 induit par leur phosphorylation a un rôle important dans la régulation de la transcription de différents gènes (**Figure 10**) (204). Dans des conditions non stimulées, ces HDACs se situent principalement dans le noyau des cellules et répriment l'activation des facteurs de transcription, tels que le MEF2 qui régule la différenciation cellulaire (180,203,217,218). Lorsqu'une kinase phosphoryle les résidus sérines des HDAC4 et HDAC5, les protéines chaperonnes 14-3-3 se lient à celles-ci (207,208,210,215). Cette interaction masque le NLS par un changement conformationnel et par conséquent cause l'export nucléaire des HDACs par l'exposition du NES (207,208). Cette liaison retient ainsi les HDACs phosphorylées dans le cytoplasme et enlève la répression sur l'activité transcriptionnelle (211,215). L'inhibition de l'export nucléaire de ces HDACs par la leptomycine B, un antagoniste des récepteurs des exportations nucléaires CRM1, a empêché l'exclusion des HDACs au cytoplasme et une accumulation de celles-ci est constatée dans le noyau des cellules (211,219). De plus, des mutations effectuées sur les sites de phosphorylation de la classe IIa des HDACs ont affaibli la liaison des protéines 14-3-3 et a subséquemment empêché leur export nucléaire

(217,220,221). Une fois que les HDACs sont déphosphorylées par des protéines phosphatases, celles-ci retournent dans le noyau à l'aide des importines (211).

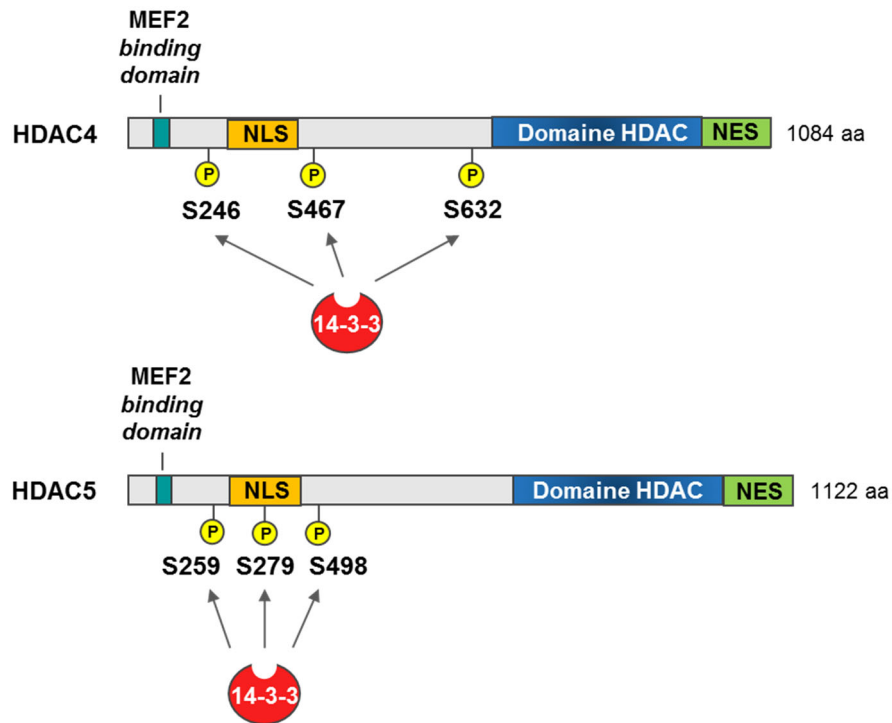


Figure 9. – La structure des histones désacétylases 4 et 5

Les HDAC4 et HDAC5 ont un *myocyte enhancer factor 2* (MEF2) *binding domain*, *nuclear localization signal* (NLS), domaine HDAC et *nuclear export signal* (NES). Les HDAC4 peuvent être phosphorylées aux résidus sérines 247 (S247), S467 et S632 et les HDAC5 peuvent être phosphorylées aux résidus S259, S279 et S498, permettant ainsi la liaison des protéines 14-3-3. (Figure adaptée de (203,222))

3.4.5 Phosphorylation-dependent nucleocytoplasmic shuttling des HDAC4 et HDAC5 dans les cellules musculaires lisses vasculaires

Des kinases induites par divers stimuli ont le potentiel de phosphoryler et induire l'export nucléaire des HDAC4 et HDAC5. Dans les CMLVs, trois kinases activées par l'Ang II, telles que la PKC, la protéine kinase D (PKD) et la CaMKII, jouent ce rôle (218,223).

3.4.5.1 Protéine kinase C (PKC) - Protéine kinase D (PKD)

L'Ang II induit la phosphorylation des HDAC5 aux S259 et S498 dans les CMLVs (223). La phosphorylation des HDAC5 requiert l'implication des AT₁R. De plus, la PKC est nécessaire afin d'induire la phosphorylation des HDAC5. L'inhibition de la PKC a diminué la phosphorylation des HDAC5 (223). La phosphorylation des HDAC5 induite par l'Ang II implique aussi l'activation de la PKD1, un effecteur en aval de la PKC ayant un rôle dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires (223,224). L'inhibition pharmacologique ou le knockdown (KD) de la PKD1 par des petits ARN interférents (siRNA) a atténué la phosphorylation des HDAC5 (223). L'exclusion nucléaire des HDAC5 est notamment dirigée par la PKC et PKD1 induite par l'Ang II (223). L'Ang II induit la phosphorylation et l'export nucléaire des HDAC5 via la voie signalétique PKC-PKD1 dans les CMLVs (223). Par ailleurs, la contribution de ces deux kinases est observée dans les cardiomyocytes (219).

3.4.5.2 *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II* (CaMKII)

Une stimulation avec de l'Ang II ou du *platelet-derived growth factor* (PDGF) induit la phosphorylation des HDAC4 aux S632 et HDAC5 aux S498 et contribue à leur export nucléaire dans des CMLVs (218). Des études antérieures ont montré que l'Ang II et le PDGF activent la CaMKII (225-227). Ginnan et al. démontrèrent que la CaMKII δ_2 interagit directement avec les HDAC4 et HDAC5 (218). De plus, les HDAC4 sont des médiateurs en amont des HDAC5. La délétion de l'expression des HDAC4 diminue la phosphorylation des HDAC5 induite par l'Ang II ou le PDGF (218). La CaMKII est donc essentielle dans la phosphorylation et l'exclusion nucléaire des HDAC4 et HDAC5 dans les CMLVs stimulées par l'Ang II ou le PDGF (218). La CaMKII contribue aussi à la phosphorylation de ces HDACs dans différents types cellulaires, notamment les muscles squelettiques et cardiomyocytes (228-230).

En résumé, l'Ang II induit la phosphorylation et l'export nucléaire des HDAC4 et HDAC5 à l'aide de la PKC, PKD ou CaMKII dans les CMLVs. Par ailleurs, l'Ang II est un activateur des MAPK et de l'Akt, mais leurs rôles dans la phosphorylation et l'exclusion nucléaire de ces HDACs restent inexplorés.

3.5 Classe IIa des HDACs et les pathologies vasculaires

Une suractivation de la classe IIa des HDACs contribue aux maladies vasculaires, telles que l'hypertrophie cardiaque, l'athérosclérose et l'hypertension (187,192,203).

3.5.1 Hypertrophie cardiaque

L'hypertrophie cardiaque est associée à une adaptation musculaire anormale du cœur par l'épaississement du muscle cardiaque (231). La taille des cardiomyocytes augmente et la composition du muscle cardiaque change. L'hypertrophie cardiaque peut être causée dans des conditions physiologiques ou pathologiques (231). Les HDACs de la classe IIa, particulièrement les HDAC4 et HDAC5, sont des régulateurs importants de la répression des gènes associés au développement de l'hypertrophie cardiaque (203,217). Les HDAC4 et HDAC5 répriment l'activation de MEF2, un facteur de transcription qui contribue à la différenciation cellulaire et à la progression de l'hypertrophie cardiaque (**Figure 10**) (217,232). Lorsque ces HDACs sont phosphorylées, celles-ci se déplacent hors du noyau et l'activation de MEF2 induit la transcription des *monocyte chemotactic proteins 1* (MCP1) et *nuclear receptors 77* (Nur77) qui sont des gènes reliés au développement de cette pathologie (218). De plus, la CaMKII contribue à l'activation de MEF2 et de ses effecteurs en aval, MCP1 et Nur77. La PKD est aussi impliquée dans l'activité transcriptionnelle de MEF2 à l'aide des HDAC5 (223). Les kinases CaMKII, PKC et PKD sont donc des régulateurs importants de la phosphorylation et l'exclusion nucléaire des HDAC4 et HDAC5, ainsi que de l'activation de la transcription de gènes contribuant à l'hypertrophie cellulaire (218,223).

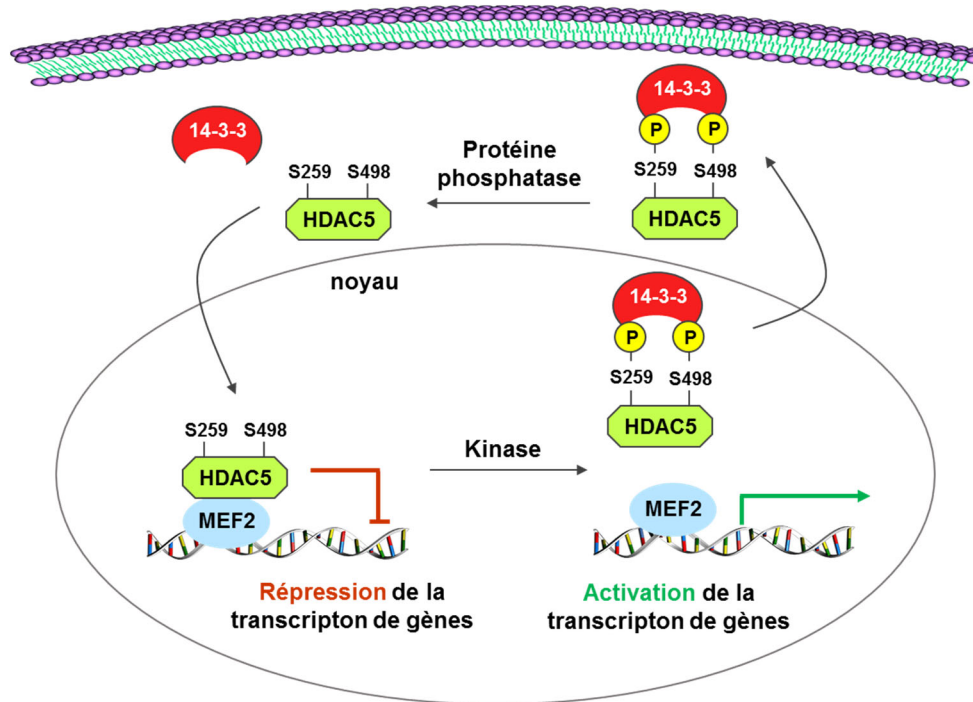


Figure 10. – Le nucleocytoplasmic shuttling des HDAC5 sur l’activation du facteur de transcription *myocyte enhancer factor 2*

À l’état basal, les HDAC5 répriment l’activité transcriptionnelle du facteur de transcription *myocyte enhancer factor 2* (MEF2) dans le noyau des cellules. Sous un stimulus, certaines kinases phosphorylent les résidus sérines des HDAC5 et les protéines chaperonnes 14-3-3 se lient à celles-ci. Cette action cause l’export nucléaire des HDAC5 et induit alors l’activation de MEF2. Lorsque les phosphatases déphosphorylent les HDAC5 situées au cytoplasme, les HDAC5 retournent au noyau et répriment la transcription de gènes. (Figure adaptée de (204,219))

3.5.2 Athérosclérose

La classe IIa des HDACs contribue au développement de l’athérosclérose. Un remodelage vasculaire est observé dans cette maladie et ces HDACs sont impliquées dans le changement phénotypique des CMLVs (177,202,233). Les HDAC4 et HDAC5 contribuent à la prolifération et migration des CMLVs près des plaques athérosclérotiques. L’inhibition des HDAC4/5 diminue la prolifération et migration cellulaires ainsi que la production des ROS (233). De plus, une élévation de la présence des molécules pro-inflammatoires, telles que les *vascular cell adhesion proteins 1* (VCAM-1) et *intercellular adhesion molecules 1* (ICAM-1), est constatée dans les

lésions athérosclérotiques (234,235). L'inhibition des HDAC4 atténue l'expression des VCAM-1 dans les CMLVs (235). Une augmentation de la sécrétion des molécules inflammatoires affecte graduellement la stabilité des plaques athérosclérotiques et la disruption de ces plaques cause des dommages sévères et même mortels (236).

3.5.3. Hypertension

La classe IIa des HDACs joue un rôle important dans l'hypertension. Le développement de l'hypertension est étroitement relié au changement phénotypique des CMLVs, ce qui augmente l'épaisseur de la tunique média. Une élévation de l'expression des HDAC4 et HDAC5 est remarquée dans un modèle d'animal hypertendu (117). Les HDAC4 contribuent à la progression de l'hypertension par l'activation des molécules pro-inflammatoires vasculaires (235).

Comme mentionnée antérieurement, une augmentation de l'expression de l'Akt et l'Egr-1 est remarquée dans des conditions pathologiques (101,102,139,140). Toutefois, aucune relation n'a été établie avec les HDACs de la classe IIa.

3.6 Inhibition des HDACs

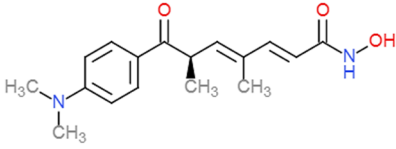
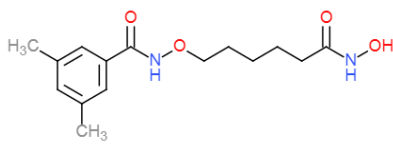
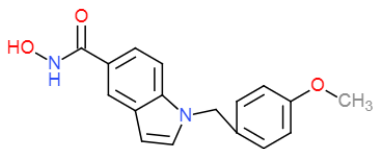
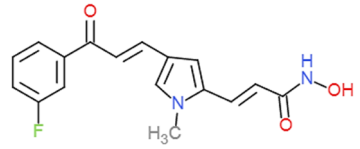
L'implication des HDACs dans différentes pathologies a suscité le développement des inhibiteurs pour contrer leur activation. Les inhibiteurs des HDACs (HDACi) agissent par un blocage réversible ou irréversible du site actif (176). Les HDACi sont regroupés sous quatre classes selon leur structure comme montré dans le **Tableau 1**. Certains de ces inhibiteurs sont approuvés par l'*United States Food & Drug Administration* (FDA) pour le traitement des cancers et/ou en études cliniques (176,237-239). Par ailleurs, d'autres HDACi ont montré des effets bénéfiques sur le système vasculaire en réduisant la prolifération des CMLVs et la pression sanguine induites par des facteurs de croissance ou des peptides vasoconstricteurs (**Tableau 2**) (240-243).

Tableau 1. – Les inhibiteurs des histones désacétylases

Classe de l'inhibiteur	Nom chimique	Nom commercial	Classe ciblée des HDACs	Traitement(s) approuvé(s) par la FDA
Acide hydroxamique	<i>Tricostatin A (TSA)</i>		Pan	
	<i>Suberanilohydroxamic acid (SAHA)</i>	Vorinostat Zolinda®	Pan	Lymphome cutané à cellules T
	PDX101	Belinostat Beleodap®	Pan	Lymphome périphérique à cellules T
	LBH598	Panobinostat Farydak®	Pan	Myélome multiple
	SB939	Pracinostat	Pan	
Acide gras de courte chaîne	Acide butyrique		I, II	
	Acide valproïque	Depacon®	I, IIa	Épilepsie, migraine, troubles bipolaires
	AN-9	Pivanex®	I, II	
Peptide cyclique	<i>Apicidin</i>		I	
	<i>Trapoxin (TPX)</i>		I	
	FK228	Romidepsin Istodax®	I	Lymphome cutané à cellules T
	<i>Largazole</i>		I	
	CHAP31		I	
Benzamide	MS-275	SNDX-275 Entiostat®	I	
	CI-994		I	
	MGCD0103		I	

Tableau adapté de (180,237,238)

Tableau 2. – Les effets des inhibiteurs des HDACs sur le système vasculaire

Nom chimique	Classe ciblée des HDACs	Structure	Effets sur le système vasculaire
TSA	Pan		<i>In vitro</i> (240): <ul style="list-style-type: none"> • ↓ prolifération cellulaire induite par le PDGF • ↓ synthèse d'ADN induite par le PDGF
LMK235	I		Chez les souris hypertendues induites par l'Ang II et les rats SHR (241): <ul style="list-style-type: none"> • ↓ pression artérielle systolique (PAS) • ↓ épaisseur de la paroi aortique • ↑ production de NO = ↑ relaxation
PCI34051	I		Chez les souris hypertendues induites par l'Ang II (242): <ul style="list-style-type: none"> • ↓ PAS • ↓ épaisseur de la paroi aortique • ↓ inflammation • ↑ production de NO
MC1568	Ila		Chez les souris hypertendues induites par l'Ang II (243): <ul style="list-style-type: none"> • ↓ PAS • ↓ épaisseur de la paroi aortique • ↓ hyperplasie des CMLVs

3.6.1 Inhibiteurs de la classe IIa des HDACs

La majorité des HDACi est considérée comme des inhibiteurs *pan-HDAC*, car ils affectent l'activité catalytique des classes I, II et IV des HDACs. Ces HDACi ne sont pas spécifiques envers une classe ou un HDAC en particulier (238). La classe II des HDACs est résistante aux inhibiteurs couramment utilisés (244). Une suggestion associée à leur inefficacité d'inhibition est la substitution de la tyrosine en histidine dans le site actif. Le développement des inhibiteurs spécifiques pour la classe IIa des HDACs devient une thérapie intéressante pour traiter les MCVs.

En 2005, la découverte de la molécule MC1568 devient le premier inhibiteur ayant une spécificité pour la classe IIa des HDACs (245). Un modèle de souris ayant subi une ligature carotidienne a montré une diminution de l'hyperplasie néointimale au niveau de la lésion, suite à un traitement avec le MC1568 (233). L'administration du MC1568 chez des souris devenues hypertendues par une infusion d'Ang II a réduit l'épaisseur de la paroi vasculaire et la pression artérielle (243). Les traitements *in vivo et in vitro* avec le MC1568 ont aussi diminué l'expression des gènes régulant le cycle cellulaire, tels que le facteur de transcription E2F3 et la cycline E, induite par l'Ang II (243). De plus, l'administration du MC1568 a atténué l'hyperplasie, l'hypertrophie, la migration cellulaires et la présence de ROS dans des conditions pathologiques (233,243). Malgré le rôle potentiel du MC1568 à contrer les effets prolifératifs et hypertrophiques des cellules, certaines études rapportent l'inefficacité de cette molécule à inhiber l'activité catalytique de la classe IIa des HDACs (246,247).

En 2013, de nouveaux inhibiteurs de la classe IIa des HDACs ont été découverts et ils possèdent un *nonchelating zinc-binding group* minimisant ainsi les actions hors cibles. Les inhibiteurs TMP-195 et TMP-269 sont les plus efficaces parmi ceux-ci. Ils répriment visiblement l'activité catalytique de la classe IIa des HDACs, contrairement à l'inhibiteur MC1568 (247,248). Ces nouveaux HDACi sont moins explorés dans les MCVs en raison de leur plus récente découverte.

Le développement des inhibiteurs spécifiques pour la classe IIa des HDACs reste un défi. Le potentiel de ces HDACi est un enjeu important parce que ces HDACs régulent la transcription de plusieurs gènes qui ont chacun leur fonction (203,206). Une meilleure compréhension de la régulation et des interactions de la classe IIa des HDACs permettrait de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour une variété de pathologies, en particulier les MCVs.

4.1 Hypothèses et buts de cette étude

La régulation de la concentration de l'Ang II joue un rôle crucial dans des conditions physiologiques et pathophysiologiques. Une augmentation de l'Ang II induit plusieurs cascades signalétiques, telles que les MAPK et la PI3K/Akt, qui contribuent au développement des MCVs en promouvant la prolifération, la migration, la survie, ainsi que l'hypertrophie des CMLVs (13,40). L'Ang II active également de nombreux facteurs de transcription, notamment l'Egr-1 (141,142). Le niveau d'expression de l'Egr-1 est faible dans les conditions basales, mais bien élevé lors des dommages et pathologies vasculaires (139,140). Par ailleurs, la transcription de gènes est induite par des HDACs qui sont responsables de désacétyler les lysines sur les histones et non-histones (176). L'Ang II induit la phosphorylation de la classe IIa des HDACs, telles que les HDAC4 et HDAC5, à l'aide des kinases PKC, PKD et CaMKII et une augmentation de ces HDACs phosphorylées contribue aux MCVs (187,203,218,223). Dans des conditions quiescentes, les HDAC5 sont localisées dans le noyau et répriment la transcription de gènes. Lors de la phosphorylation des HDAC5, elles sont exportées hors du noyau et l'activité transcriptionnelle des gènes associés à l'hyperplasie, l'hypertrophie et la survie cellulaire devient active (203,218,223).

Bien que l'Ang II soit un puissant activateur des voies des MAPK et de la PI3K/Akt (13,40), l'implication de ces voies de signalisation dans la régulation des HDAC5 reste inexplorée. De plus, la contribution des HDAC5 dans l'expression de l'Egr-1 n'est pas connue.

Nous émettons alors deux hypothèses :

- 1) La voie de l'ERK1/2 et de la PI3K/Akt contribuent à la phosphorylation des HDAC5, puisque celles-ci sont activées dans de nombreuses pathologies vasculaires (40);
- 2) Les HDAC5 ont un effet sur l'activité de l'Egr-1 parce que ces HDACs ont tendance à interagir avec des facteurs de transcription impliqués dans les anomalies vasculaires (187,192,203).

Les buts de cette étude sont donc les suivants :

- 1) Investiguer la voie de l'ERK1/2 et de la PI3K/Akt dans la phosphorylation et l'export nucléaire des HDAC5 induits par l'Ang II;
- 2) Examiner le rôle des HDAC5 dans l'activation de l'Egr-1 induite par l'Ang II;

3) Investiguer l'implication des HDAC5 et de l'Egr-1 dans l'hypertrophie vasculaire induite par l'Ang II dans les CMLVs.

Chapitre 2 – Article

Angiotensin II-Induced Histone Deacetylases 5 Phosphorylation, Nuclear Exclusion and Egr-1 Expression is Mediated by the PI3K/Akt Pathway in Rat Vascular Smooth Muscle Cells

Vanessa Truong¹, Ashish Jain¹, Madhu B. Anand-Srivastava², Ashok K. Srivastava^{1,3}

In preparation for submission

1. Laboratory of Cellular Signaling, Montreal Diabetes Research Center and Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, QC H2X 0A9, Canada

2. Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, H3C 3J7, Canada

3. Department of Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC H3C 3J7, Canada.

Corresponding author: Ashok K. Srivastava (email: ashok.srivastava@umontreal.ca)

Abstract

Angiotensin II (Ang II) is an important vasoactive factor that regulates an array of physiological and pathological responses in vascular smooth muscle cells (VSMCs) by inducing signaling events that mediate proliferation, hypertrophy, migration and gene transcription. We have showed earlier that Ang II induces the expression of early growth response protein-1 (Egr-1), a zinc finger transcription factor which is upregulated in vascular pathologies. Histone deacetylases (HDACs) deacetylate lysine residues in proteins and modulate the expression of genes implicated in VSMC growth and hypertrophy. However, the involvement of Ang II-induced ERK1/2 and PI3K/Akt pathways in HDAC5 phosphorylation and nuclear export, as well as the contribution of HDAC5 in Egr-1 expression and hypertrophy in VSMCs remain unexplored. Here, we show that pharmacological blockade of the ERK1/2 pathway by U0126 was ineffective in reducing Ang II-induced HDAC5 phosphorylation and its nuclear exclusion. In contrast, the inhibition of the PI3K/Akt pathway either by wortmannin/SC66 or siRNA-induced silencing of Akt attenuated Ang II-induced HDAC5 phosphorylation and its nuclear export. Similar to its effect on HDAC5 phosphorylation, SC66 or Akt knockdown also suppressed Ang II-induced Egr-1 expression. Furthermore, pharmacological inhibition of HDAC5 by MC1568 or TMP-195, or knockdown of HDAC5 as well as the blockade of the nuclear export of HDAC5 by leptomycin B or KPT-330 significantly reduced Ang II-induced Egr-1 expression. In addition, depletion of either HDAC5 or Egr-1 by siRNA attenuated VSMC hypertrophy in response to Ang II. In summary, our results demonstrate that Ang II-induced HDAC5 phosphorylation and its nuclear exclusion is mediated by PI3K/AKT and not the ERK1/2 pathway, and HDAC5 is an upstream regulator of Egr-1 expression and hypertrophy in VSMCs.

Keywords: Angiotensin II, histone deacetylases 5, PI3K/Akt, Egr-1, hypertrophy, vascular smooth muscle cells

1. Introduction

The development of cardiovascular diseases such as atherosclerosis and hypertension is associated with vascular remodeling (1,2). Phenotypic switch of vascular smooth muscles cells (VSMCs) from a contractile to a synthetic state, in which they are more likely to proliferate and migrate has been suggested to contribute to neointima formation and vascular remodeling (3,4). Although the etiology of cardiovascular diseases is complex, it is generally believed to be associated with an increased activation of the renin-angiotensin-system (RAS) (5,6). One major downstream effector of RAS is angiotensin II (Ang II), a vasoactive peptide, whose elevated level of activation has been shown to induce the phenotypic switch in VSMCs (7-9). Ang II activates signaling cascades that promote proliferation, hypertrophy and migration of VSMCs leading to neointimal thickening (7,10). The signaling pathways induced by Ang II include the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB/Akt) pathways, known to regulate the expression of genes and transcription factors involved in vascular remodeling (7-11).

Early growth response protein-1 (Egr-1) is a zinc finger transcription factor implicated in the transcription of several genes involved in the proliferation, inflammation and differentiation of VSMCs (12-17). A heightened expression of Egr-1 has been reported in atherosclerotic lesions and in animal models of vascular injury (12,18-20). We have reported earlier that growth factors and vasoactive peptides, such as Ang II, endothelin-1 and insulin-like growth factor (IGF-1), induce the expression of Egr-1 in VSMCs (14-16,21-23). We have also showed that activation of the ERK1/2 and PI3K/Akt pathways is required to induce Egr-1 expression in these cells (16,17,23).

Histone deacetylases (HDACs) remove acetyl groups from the histones and non-histone proteins leading to a decrease in the accessibility of chromatin and subsequently repress gene transcription (24). HDACs have been divided into 4 classes. Class I, II and IV HDACs are considered as classical HDACs with zinc-dependent deacetylase activity and class III HDACs, also known as sirtuins, are NAD⁺-dependent enzymes. Class II HDACs are further divided into two groups, class IIa and IIb HDACs (24-26). Several growth factors and vasoactive peptides induce

the phosphorylation of class IIa HDACs, notably HDAC4 and HDAC5, resulting in its nuclear exclusion (25,26). A role of protein kinase C (PKC), protein kinase D (PKD) or calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) as putative protein kinase to induce the phosphorylation of HDAC4/5, in response to Ang II in VSMCs has been reported (27,28). Although Ang II is a potent activator of the MAPK and PI3K/Akt pathways (7-10), which regulate transcription of genes related to vascular remodeling, the involvement of these pathways in HDAC5 phosphorylation and its nuclear export as well as the role of HDAC5 in Egr-1 expression in VSMCs remain unexplored. Therefore, in this study, we investigated the implication of the MAPK and PI3K/Akt pathways in Ang II-induced HDAC5 phosphorylation and its nuclear exclusion, and the implication of HDAC5 in Ang II-induced Egr-1 expression and hypertrophy in rat VSMCs.

2. Materials and methods

2.1 Antibodies and reagents

Ang II (#A9525), wortmannin (PI3K inhibitor) (#W1628), SC66 (Akt inhibitor) (#SML0261), U0126 (MEK1 and MEK2 inhibitor) (#19-147), leptomycin B (nuclear export inhibitor) (#L2913), poly-L-lysine solution (#P4707) and goat serum (#G9023) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, CANADA). MC1568 (class IIa HDAC inhibitor) (#S8502) and KPT-330 (nuclear export inhibitor) (#S7252) were purchased from Selleckchem (Houston, TX, USA). TMP-195 (class IIa HDAC inhibitor) (#23242) was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Phosphorylated HDAC5 (#AB47283) was purchased from Abcam (Toronto, ON, CA). HDAC5 (#SC-133106) and phosphorylated ERK1/2 antibodies (#SC-16982) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Phosphorylated Akt (#3787S), Akt (#4685S), ERK1/2 (#4695S), Egr-1 (#4153S), β -tubulin (#2146S), anti-rabbit IgG (#7074S) and anti-mouse IgG (#7076S) antibodies were from Cell Signaling (Beverly, MA, USA). Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (#A-11001) and DAPI (#D1306) were obtained from Life Technologies, Molecular Probes (Grand Island, NY, USA). The enhanced chemiluminescence (ECL) detection system kit was from Bio-Rad (Montreal, QC, CA). Scrambled (#SR30004) and Akt (#SR500756) siRNA duplexes were obtained from Origene (Rockville, MD, USA). HDAC5 (#S136739) and Egr-1 (#199884) siRNA duplexes, Opti-MEM™ (#31985070) and Lipofectamine RNAi Max (#13778-075) were purchased from Life Technologies (Burlington, ON, CA).

2.2 Cell culture

A10 VSMCs (#CRL-1476) derived from the thoracic aorta of embryonic rats were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA). VSMCs were cultured with Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and 1% (v/v) penicillin/streptomycin. The VSMCs were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Experiments were done with cells grown to 80-90% confluence and in an antibiotic-free DMEM 24 hours before treatment. The cells were used between passages 3 to 10.

2.3 Cell lysis and immunoblotting

Serum-starved VSMCs were incubated in the absence or presence of various reagents for 30 minutes or 24 hours, followed by stimulation with 100 nM Ang II. The cells were lysed with radio-immunoprecipitation (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Na-deoxycholate, 1% (v/v) NP-40, 0.1% sodium dodecyl sulphate, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 50 mM NaF, 1% (v/v) phenylmethylsulphonyl fluoride, 1% (v/v) protease inhibitor cocktail and 1% (v/v) orthovanadate). Protein concentrations were determined by Bradford assay and subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to Immobilon-P-polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore) before immunoblotting. Incubation of the blots with primary antibody was performed overnight at 4°C either with 5% non-fat dried milk powder or 0.2% (w/v) I-BLOCK protein-based blocking reagent. Phospho-HDAC5 (1:1000), HDAC5 (1:1000), phospho-Akt (1:1000), Akt (1:2000), phospho-ERK1/2 (1:2000), ERK1/2 (1:2000), Egr-1 (1:1000) and β -tubulin (1:5000). Incubation of the blots with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody was performed at room temperature for 60 min. The protein bands were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) using a ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad). The intensity of the bands was quantified by densitometric analysis using ImageJ and GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, USA) software programs.

2.4 Transfection with small interfering RNA

For gene knockdown, 10 nmol/L rat Akt, HDAC5, Egr-1 or non-specific (scrambled) siRNA duplexes were mixed with Opti-MEM™ and Lipofectamine RNAi Max according to the manufacturer's guideline. Cells were transfected with siRNAs at 40-50% confluency for 6 hours. Cells were subsequently incubated for 48 hours at 37°C in DMEM containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin prior to stimulation with Ang II.

2.5 Immunofluorescence and fluorescent microscopy

VSMCs were seeded on poly-L-lysine coated coverslips. After treating the cells with various reagents, they were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde for 10 min and permeabilized in 0.2% Triton X-100 in PBS for 5 min. Cells were blocked with 5% goat serum in PBS for 60 min at room temperature and were incubated with the primary antibody (HDAC5 (1:100)) in the blocking serum, overnight at 4°C in a humidified chamber. Cells were then incubated with the goat anti-mouse IgG Alexa Fluor® 488 (1:200) in 5% goat serum in PBS. Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride in PBS for 1 min. Cells were imaged with a Zeiss AxioObserver Z1 Spinnig disk confocal microscope.

2.6 Cell staining and fluorescent microscopy

VSMCs were seeded on poly-L-lysine coated coverslips. Cell were transfected and stimulated with 100 nM Ang II, they were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde for 15 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 15 min and stained with the HSC CellMask™ Stain according to the manufacturer's protocol. Cells were imaged with a Leica TCS SP8 MP confocal microscope and the cell volume was quantified with the use of Microscopy Image Analysis Software.

2.7 Statistics

All the data are reported as means \pm SEM of 3-5 independent experiments. Data analysis was performed by one-way, repeated-measures analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc test with the use of GraphPad Prism 8. The differences between means were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. The PI3K/Akt pathway is involved in Ang II-induced HDAC5 phosphorylation in VSMCs

An implication of various protein kinases, such as the PKC, PKD (27) and CaMKII (28), in Ang II-induced HDAC5 phosphorylation in VSMCs has been reported. However, despite the fact that Ang II is a potent activator of the ERK1/2 and PI3K/Akt pathways in VSMCs (7-10), the involvement of these signaling intermediates in inducing the phosphorylation of HDAC5 in VSMCs has not been studied. Therefore, we investigated whether this pathway mediates the phosphorylation of HDAC5 in response to Ang II in A10 VSMCs. As shown in **Fig. 1A**, stimulation of VSMCs with increasing concentrations of Ang II caused an increase in HDAC5 phosphorylation at serine 498 (S498) and 100 nM of Ang II significantly induced HDAC5 phosphorylation. As shown in **Fig. 1B**, time course studies at 100 nM of Ang II indicated that the phosphorylation of HDAC5 at S498 peaked at 15 min and then gradually declined to basal level over a 60 min period.

To determine whether ERK1/2 or PI3K/Akt pathway was responsible for Ang II-induced increase in HDAC5 phosphorylation, we utilized pathway-specific inhibitors of these signaling components. To probe the role of ERK1/2 pathway, we used U0126, which is a specific pharmacological inhibitor of MEK1/2. As shown in **Fig. 2**, pre-treatment with U0126 (10 μ M) almost completely suppressed Ang II-induced ERK1/2 phosphorylation, however, it did not alter the phosphorylation of HDAC5 induced by Ang II in A10 VSMCs. These data suggest that the ERK1/2 pathway is not responsible to induce HDAC5 phosphorylation in Ang II stimulated VSMCs.

The involvement of PI3K/Akt signalling was analyzed by using wortmannin and SC66, which are specific pharmacological inhibitors of PI3K and Akt respectively. As shown in **Figs. 3A and 3B**, concomitant to inhibiting the Akt phosphorylation, both of these inhibitors markedly reduced the phosphorylation of HDAC5 induced by Ang II in A10 VSMCs. In order to further confirm the implication of Akt in this process, we knocked down endogenous Akt by using siRNA in VSMCs. As shown in **Fig. 3C**, silencing of Akt expression inhibited HDAC5 phosphorylation induced by

Ang II whereas, the cells transfected with scrambled siRNA did not show any inhibition in HDAC5 phosphorylation.

3.2 The PI3K/Akt and not the ERK1/2 pathway is involved in Ang II-induced HDAC5 nuclear export in VSMCs

In the basal state of the VSMCs, HDAC5 is primarily located in the nucleus and represses the transcription of its target genes (25,26,29). Once HDAC5 is phosphorylated, it interacts with 14-3-3 chaperone proteins and is exported out of the nucleus leading to the derepression of the genes involved in vascular diseases (25,26,30). Therefore, by performing immunofluorescence microscopy experiments we next examined whether the ERK1/2 and PI3K/Akt pathways play a role in Ang II-induced HDAC5 nuclear exclusion. As shown in **Fig. 4**, endogenous HDAC5 (green fluorescence signal) is predominantly localized in the nuclei of unstimulated VSMCs and, stimulation of these cells with Ang II resulted in its export from the nucleus. However, pharmacological blockade of PI3K and Akt by wortmannin and SC66 respectively, resulted in a significant reduction in the nuclear exclusion of HDAC5 in Ang II stimulated VSMCs. In contrast, VSMCs pre-treated with U0126 to block MEK/ERK pathway did not inhibit the nuclear export of HDAC5. These results show the involvement of the PI3K/Akt pathway and not the ERK1/2 pathway in Ang II-induced nuclear export of HDAC5 in VSMCs.

3.3 Ang II-induced Egr-1 expression is mediated by the Akt pathway in VSMCs

We have shown earlier that activation of PI3K/Akt pathway is required to induce Egr-1 expression in response to IGF-1 (15) and since Akt is essential to induce HDAC5 phosphorylation and its nuclear export, we next examined whether the Akt pathway is also involved in Egr-1 expression in response to Ang II. As shown in **Fig. 5**, pre-treatment of VSMCs with SC66 or siRNA-induced silencing of Akt significantly reduced Ang II-induced Egr-1 expression, suggesting that similar to IGF-1, Akt is required to induce Egr-1 expression in Ang II stimulated VSMCs.

3.4 The involvement of HDAC5 in Ang II-induced Egr-1 expression in VSMCs

HDAC5 has been shown to regulate the transcriptional activity of myocyte enhancer factor 2 (MEF2), a transcription factor implicated in mediating neointima injury in VSMCs (31-33). Our

laboratory has showed that the expression of Egr-1, a zinc finger transcription factor that is also implicated in neointima formation and vascular injury (12,18-20), is potently activated by Ang II in VSMCs (16,22). Therefore, we investigated whether HDAC5 is involved in Ang II-induced Egr-1 expression. As shown in **Figs. 6A and 6B**, pre-treatment of VSMCs with specific pharmacological inhibitors of class IIa HDACs, MC1568 (10 μ M) (34) or TMP-195 (10 μ M) (35), significantly inhibited Egr-1 expression induced by Ang II. In addition, we used siRNA-mediated silencing of HDAC5 to confirm its involvement in Ang II-induced Egr-1 expression. As shown in **Fig. 6C**, similar to the effect of pharmacological inhibitors of class IIa HDACs, knockdown of HDAC5 also resulted in a decrease in Egr-1 expression compared to the cells transfected with the scrambled siRNA which had no effect on Egr-1 expression. These data suggest a role of HDAC5 in Egr-1 expression in VSMCs.

3.5 Inhibition of the nuclear export of HDAC5 on Ang II-induced Egr-1 expression in VSMCs

As mentioned earlier, the phosphorylation-dependent nuclear exclusion of HDAC5 plays a key role in the regulation of gene transcription (25,26,29) and translocation of phosphorylated HDAC5 from the nucleus to cytoplasm results in the activation of gene transcription by derepressing the activity of the transcription factor (26-28). Therefore, in order to investigate whether the blockade of the nuclear export of HDAC5 will inhibit HDAC5 nuclear exclusion and alter the expression of Egr-1 in response to Ang II, we used two structurally distinct pharmacological inhibitors of nuclear transport, leptomycin B (LMB) (50 nM) (36) and KPT-330 (100 nM) (37). As shown in **Fig. 7A**, pre-treatment of VSMCs with LMB or KPT-330 significantly reduced the nuclear exclusion of HDAC5 which was associated with the suppression of Ang-II-induced Egr-1 expression (**Figs. 7B and 7C**). These results demonstrate that HDAC5 phosphorylation and its nuclear exclusion play a key role in the regulation of the expression of Egr-1 in response to Ang II in VSMCs.

3.6 Implication of HDAC5 and Egr-1 in Ang II-induced VSMC hypertrophy

Elevated concentration of Ang II has been associated with the remodeling of vasculature by promoting cell proliferation and hypertrophy (38-40). Therefore, we next investigated the involvement of HDAC5 and Egr-1 on Ang II-induced VSMC hypertrophy by studying the

alteration in cell volume using fluorescent cell staining technique. As shown in **Fig. 8A**, VSMCs stimulated with Ang II for 24 hours showed an increase in cell size. However, siRNA-induced silencing of HDAC5 suppressed increase in cell volume. Similarly, knockdown of Egr-1 by siRNA also resulted in a reduction in cell volume as compared to cells stimulated with Ang II (**Fig. 8B**). These data suggest that HDAC5 and Egr-1 mediate the hypertrophic responses of Ang II in VSMCs (**Fig. 9**).

4. Discussion

The present study was designed to investigate the role of the ERK1/2 and PI3K/Akt signaling pathways involved in Ang II-induced HDAC5 phosphorylation, as well as its nuclear export in VSMCs. We confirmed that Ang II induces HDAC5 phosphorylation at S498 in a dose- and time-dependent manner in A10 VSMCs. In addition, by using pathway-specific inhibitors we demonstrated that Ang II-induced HDAC5 phosphorylation is not mediated by the ERK1/2 pathway. Furthermore, our studies showing that wortmannin or SC66, specific inhibitors of the PI3K/Akt pathway, caused a significant reduction in HDAC5 phosphorylation in A10 VSMCs suggested that this pathway participates in inducing the phosphorylation of HDAC5 in response to Ang II in these cells. Additional confirmation of a role of Akt in this process was provided by the results showing that siRNA-mediated silencing of Akt also attenuated HDAC5 phosphorylation in Ang II stimulated VSMCs. We further studied the role of ERK1/2 and PI3K/Akt pathways in Ang II-induced HDAC5 nuclear exclusion. Using immunofluorescent microscopy techniques, we provided evidence to support that the ERK1/2 pathway does not play a role in Ang II-induced HDAC5 exclusion, whereas, the PI3K/Akt pathway is involved in the nuclear export of endogenous HDAC5. Earlier studies have demonstrated a role of PKC-PKD (27) and CaMKII (28) in inducing the phosphorylation and nuclear exclusion of HDAC5 in VSMCs. However, our results have provided first evidence to suggest that in addition to PKC-PKD and CaMKII, Akt also participates in phosphorylating HDAC5 in Ang II stimulated VSMCs.

Class IIa HDACs, particularly HDAC4 and HDAC5, have emerged as crucial regulators of gene transcription related to cell proliferation, migration and hypertrophy with their association with different transcription factors such as the myocyte enhancer factor 2 (MEF2) and Kruppel-like factor 4 (KLF4) (28,41). Our studies showing that MC1568 or TMP-195, specific inhibitors of class IIa HDACs, and siRNA-mediated knockdown of HDAC5 suppressed Ang II-induced Egr-1 expression have provided first evidence supporting a role of HDAC5 as an upstream regulator of Egr-1 expression in VSMCs. It should be noted that administration of MC1568 was shown earlier to reduce neointimal hyperplasia in mouse model of carotid artery ligation (42). Since Egr-1 expression has been shown to be upregulated in vascular injury (19,43), it may be possible that

the reduced neointimal hyperplasia observed by Usui et al. (42) may be due to the inhibition in the expression of Egr-1. In addition, we have shown earlier that Akt pathway plays an important role in IGF-1- and H₂O₂-induced expression of Egr-1 in VSMCs (17,23). It is thus possible that Ang II-induced Egr-1 expression is mediated by an Akt-HDAC5-dependent pathway in VSMCs.

Class IIa HDACs regulate gene transcription through phosphorylation/ dephosphorylation-dependent nucleocytoplasmic shuttling pathway (25,26). Phosphorylated HDAC5 is exported out of nucleus allowing for the gene transcription to proceed (26,28). We assessed the role of nuclear export of HDAC5 in modulating the expression of Egr-1 and showed that nuclear export inhibitors LMB or KPT-330 retained HDAC5 in the cell nuclei and attenuated Ang II-induced Egr-1 expression. These results suggest that the localization of HDAC5 in the cell nuclei represses Egr-1 expression, while its nuclear exclusion in response to Ang II activates the expression of Egr-1 in VSMCs. However, the precise molecular events of that regulate Egr-1 expression by HDAC5 in Ang II stimulated cells remains to be explored further.

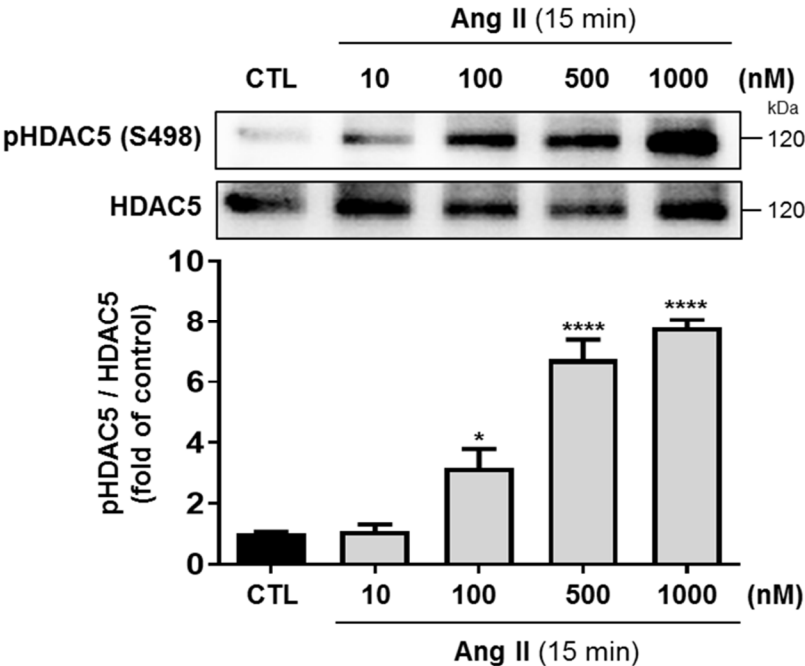
Vascular diseases are associated with the remodeling of blood vessels by thickening of the tunica media and decreasing the diameter of the lumen (1,2). In addition, VSMCs undergo a phenotype switch by differentiating contractile VSMCs to a synthetic state (4). Synthetic VSMCs are known to promote cell migration, proliferation, survival and hypertrophy (3,4). These changes can be induced by an elevated concentration of Ang II (7,10). Our results demonstrated that stimulation of VSMCs with Ang II increased the cell volume, a marker of cellular hypertrophy, which was reversed by knockdown of HDAC5 or Egr-1 highlighting a key role of HDAC5 and Egr-1 in mediating the hypertrophic response of Ang II in VSMCs.

In summary, we have shown for the first time the involvement of the PI3K/Akt pathway in Ang II-induced HDAC5 phosphorylation and its nuclear export in VSMCs, as well as demonstrated a role of HDAC5 in Ang II-induced Egr-1 expression and hypertrophy in VSMCs. Since HDAC5 has been associated with expression of genes associated with cell cycle regulation, proliferation and hypertrophy of VSMCs (26), it may be suggested that Akt-induced phosphorylation and nuclear exclusion of HDAC5 through Egr-1 may constitute as a potential mechanism leading to vascular hypertrophy and remodeling.

5. Figures

Figure 1

A



B

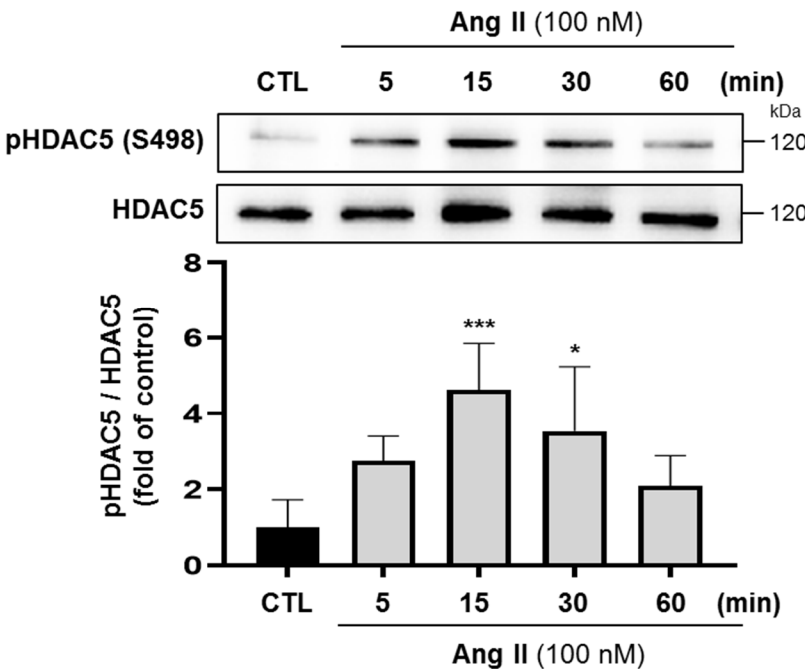


Figure 2

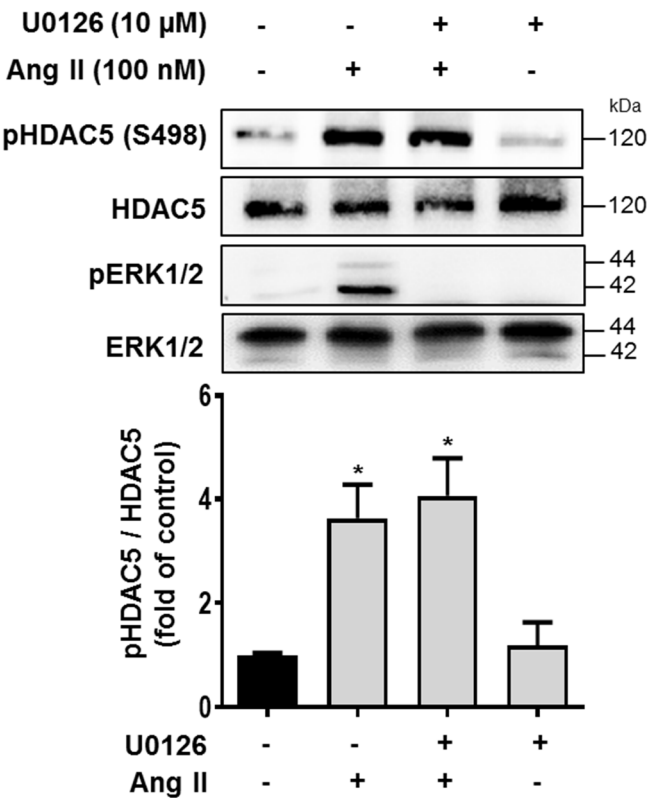
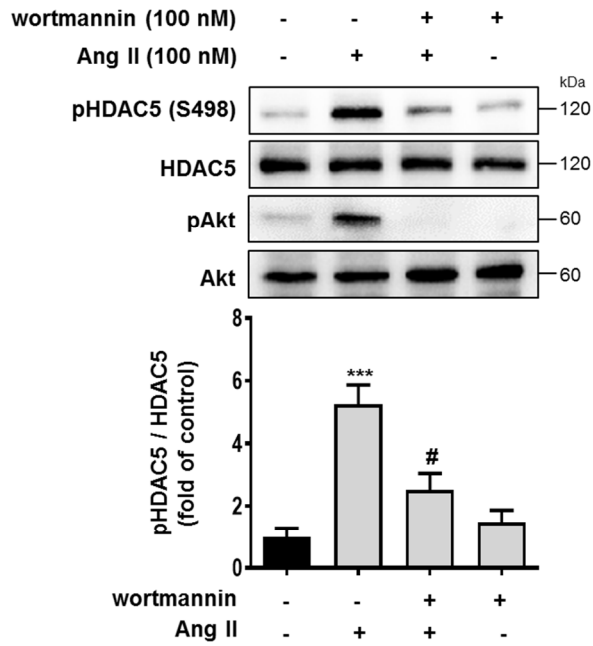
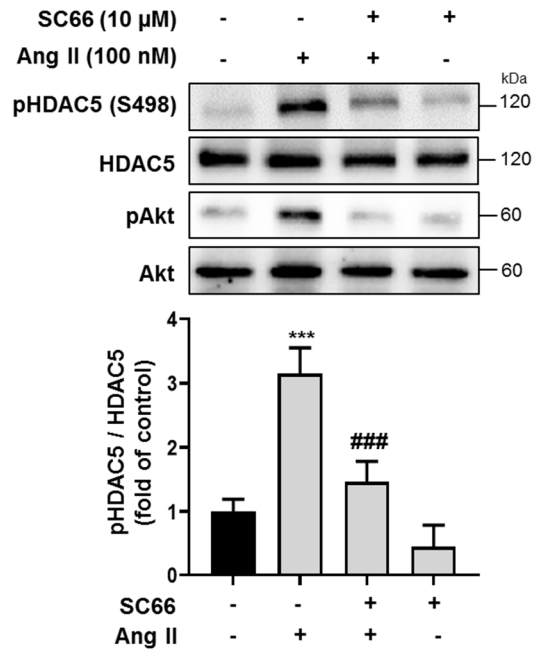


Figure 3

A



B



C

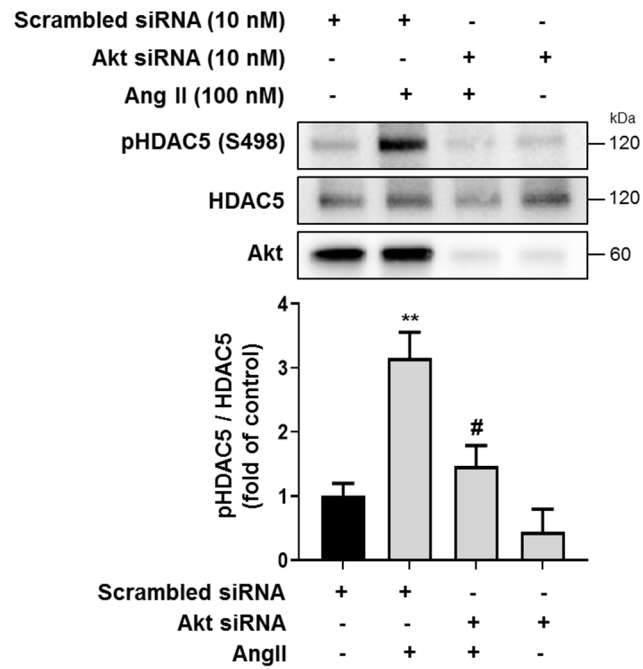


Figure 4

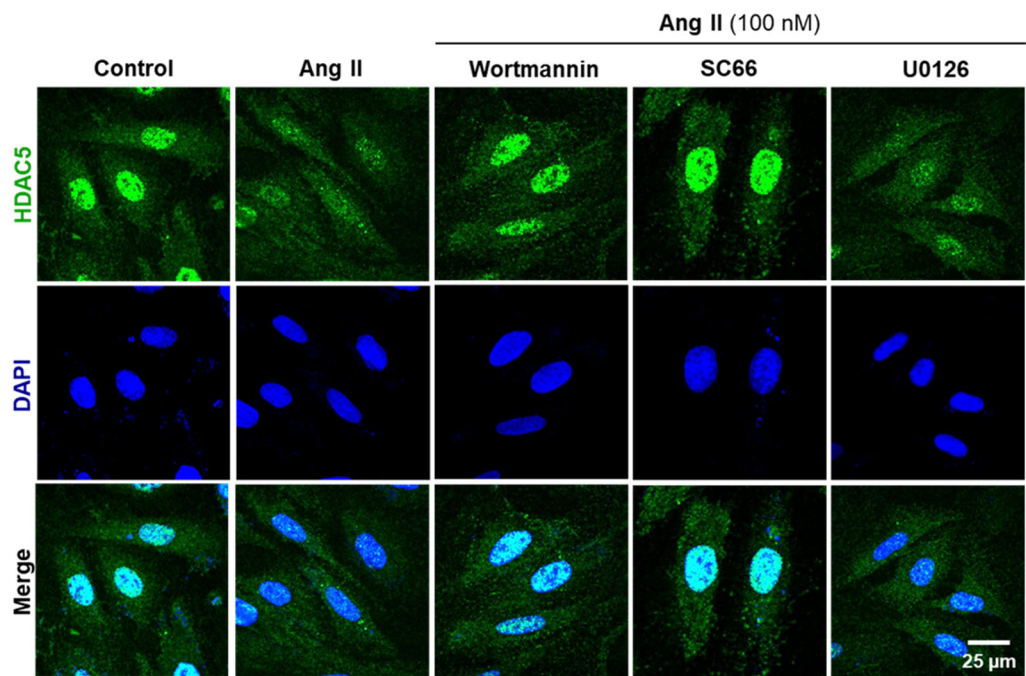
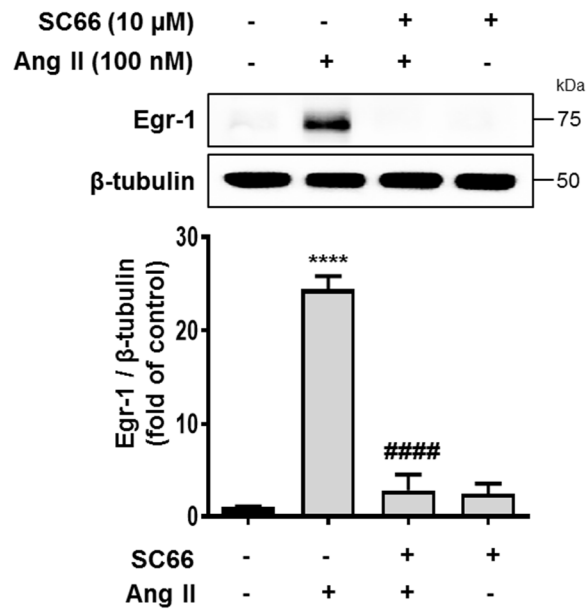


Figure 5

A



B

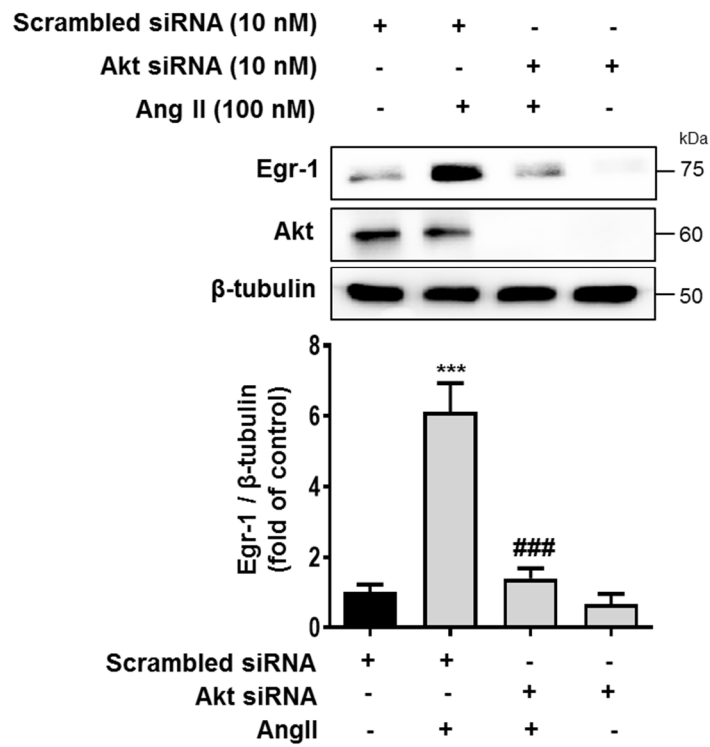
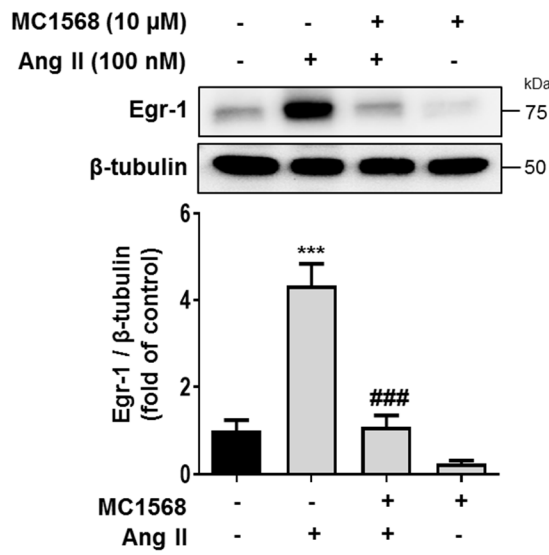
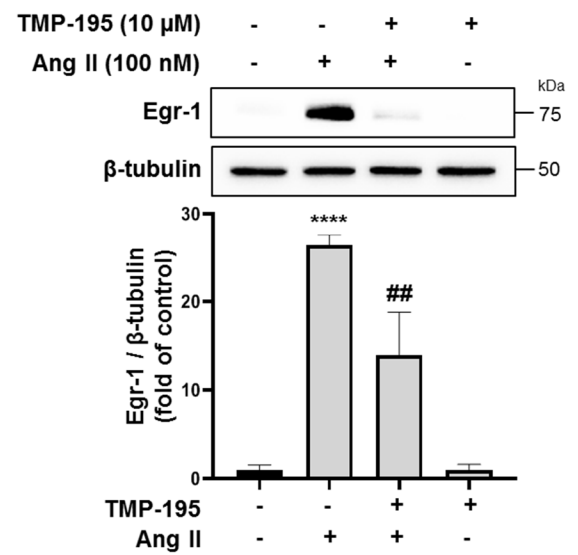


Figure 6

A



B



C

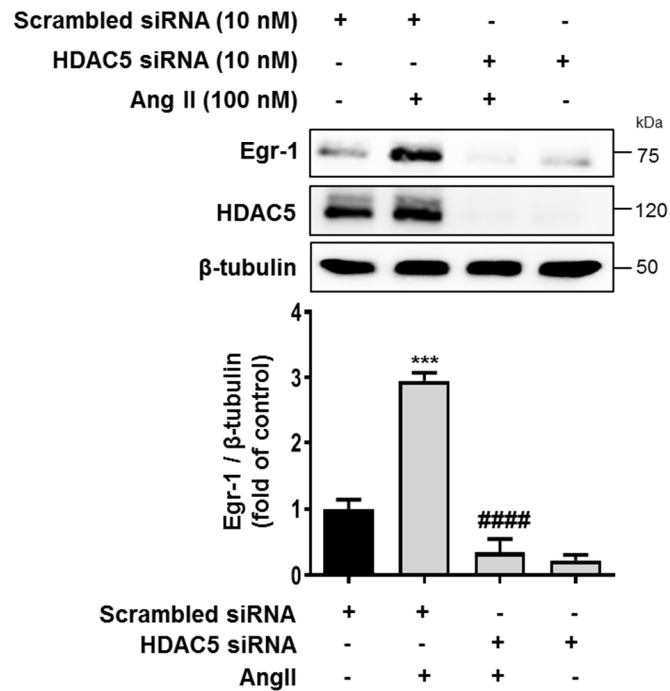


Figure 7

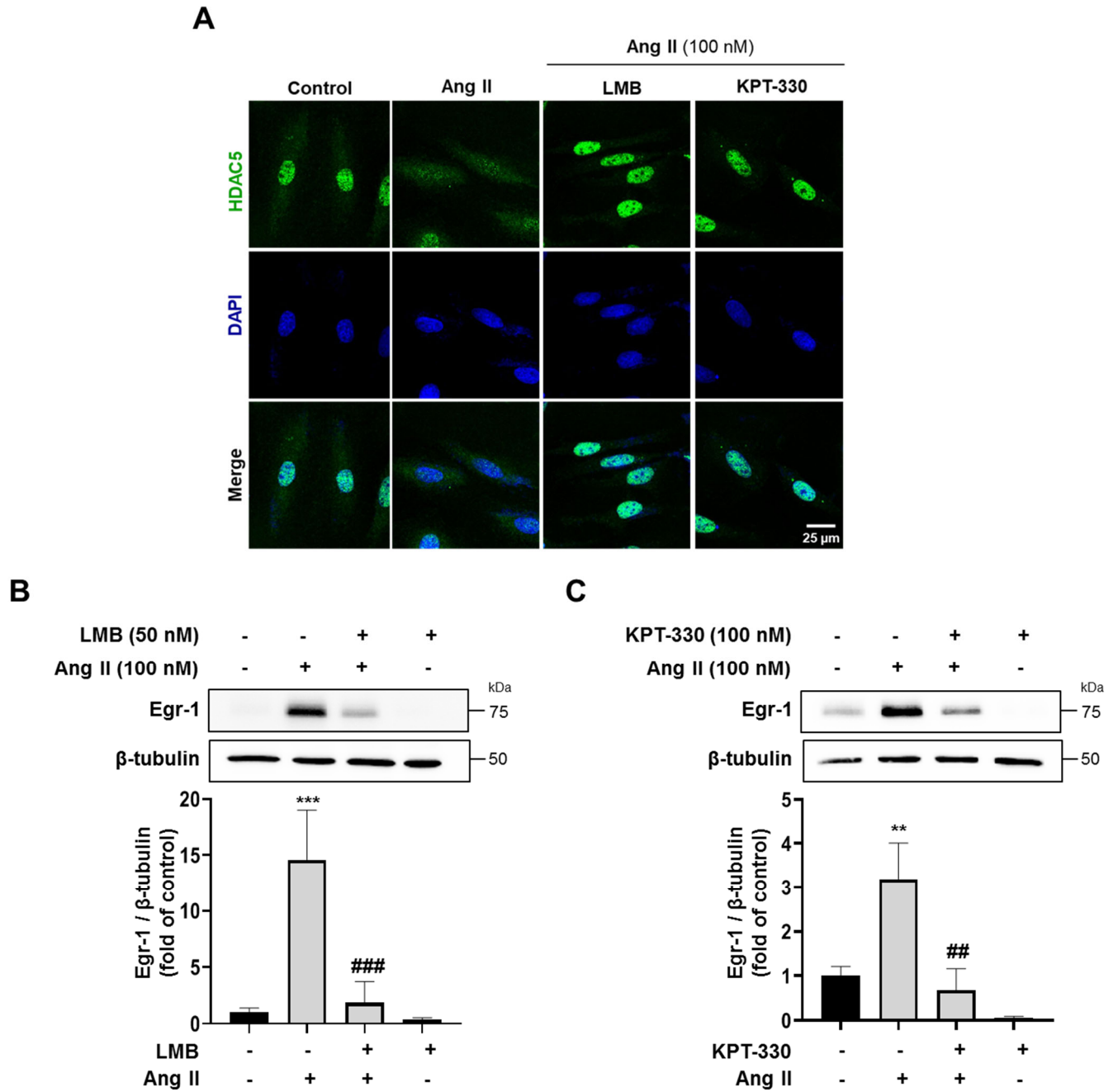
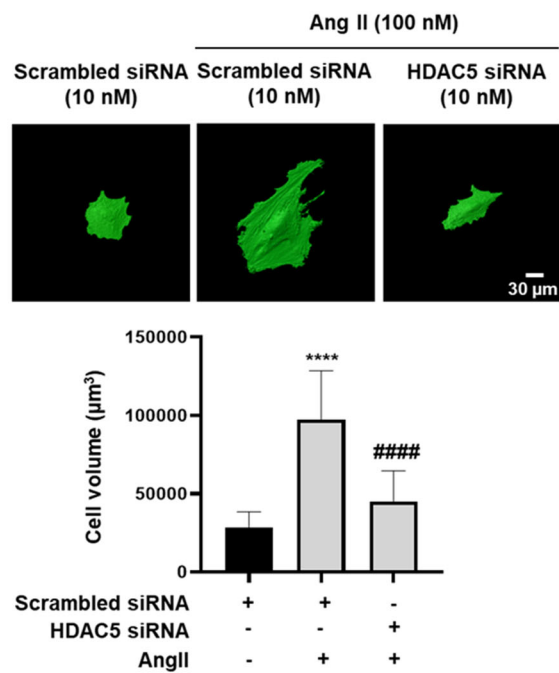


Figure 8

A



B

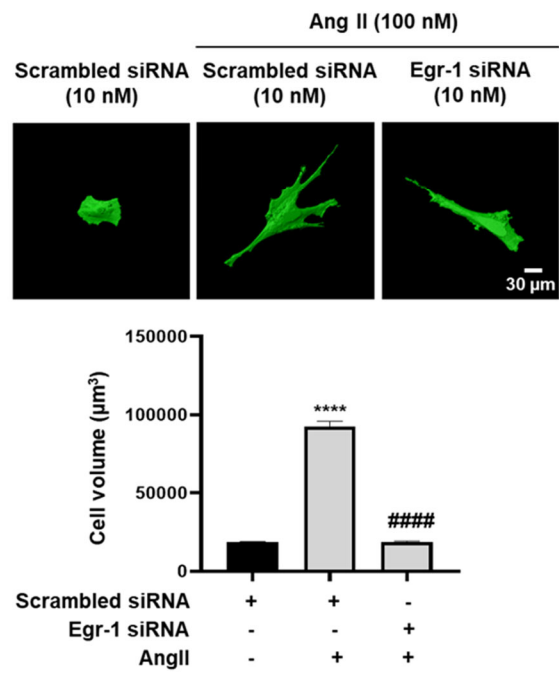
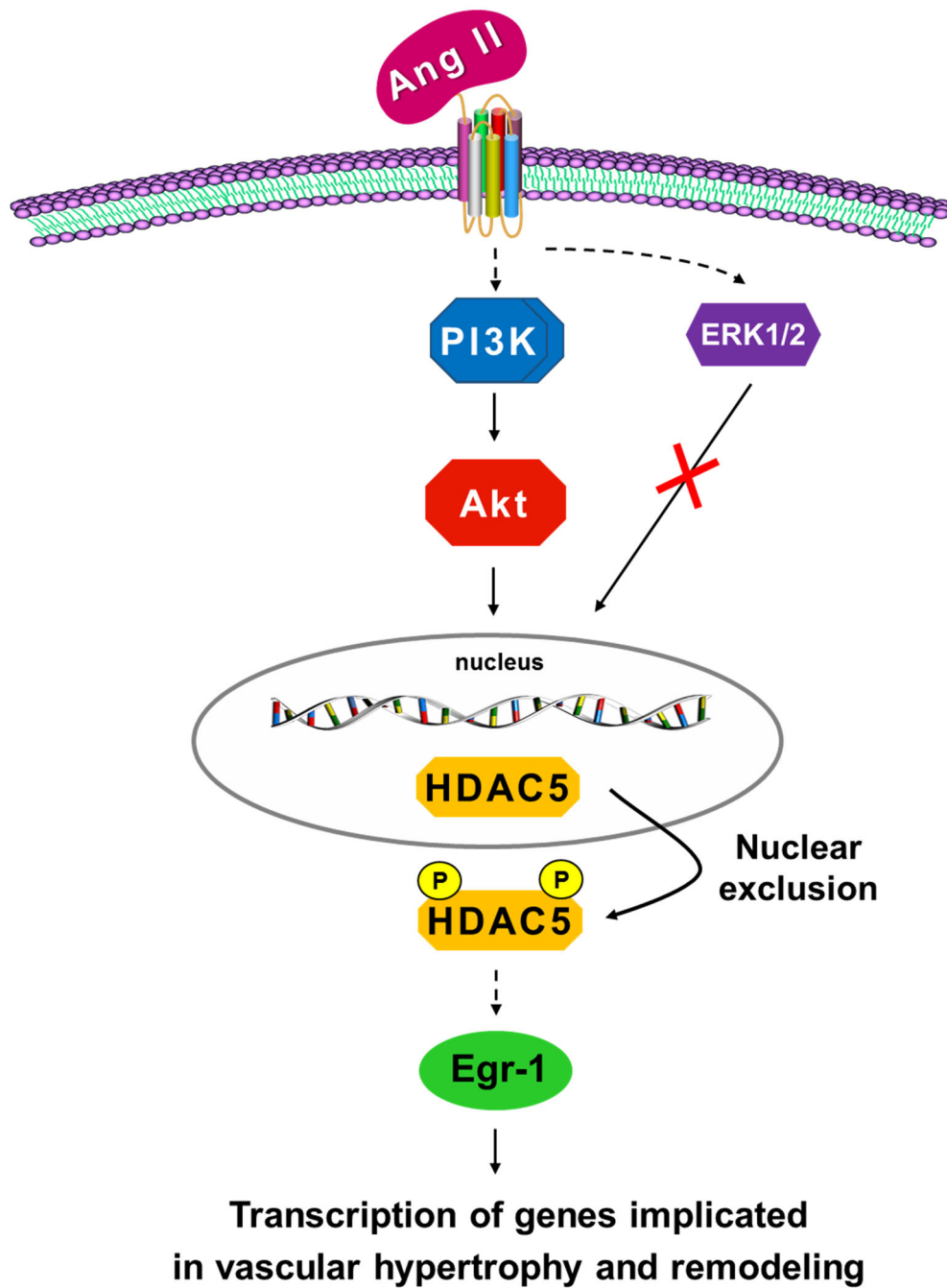


Figure 9



6. Figure legends

Figure 1. Ang II stimulates HDAC5 phosphorylation in a dose and time-dependent manner in A10 VSMCs.

Serum-starved VSMCs were incubated with increasing concentrations of Ang II for 15 min **(A)** or with 100 nM Ang II at the indicated time periods **(B)**. Cell lysates were immunoblotted with pHDAC5 (S498) and HDAC5 antibodies. The control is taken as 1 and each value aside is expressed as fold of increase compare to the CTL. Bar diagrams represent the quantification of pHDAC5 relative to HDAC5. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ compared to CTL.

Figure 2. Ang II-induced HDAC5 phosphorylation is not mediated by the ERK1/2 pathway in A10 VSMCs.

Serum-starved VSMCs were pre-treated with U0126 (MEK1/2 inhibitor) for 30 min, prior to stimulation with 100 nM Ang II for 15 min. Cell lysates were immunoblotted with pHDAC5 (S498), HDAC5, pERK1/2 and ERK1/2 antibodies. The control is taken as 1 and each value aside is expressed as fold of increase compare to the CTL. Bar diagrams represent the quantification of phosphorylated protein relative to the total protein. * $p < 0.05$ compared to CTL.

Figure 3. Ang II-induced HDAC5 phosphorylation is mediated by the PI3K/Akt pathway in A10 VSMCs.

Serum-starved VSMCs were pre-treated with wortmannin (PI3K inhibitor) **(A)**, SC66 (Akt inhibitor) for 30 min **(B)** or cells were transfected with Akt siRNA or scrambled siRNA **(C)** for 48 hours, prior to stimulation with 100 nM Ang II for 15 min. Cell lysates were immunoblotted with pHDAC5 (S498), HDAC5, pAkt and Akt antibodies. The control is taken as 1 and each value aside is expressed as fold of increase compare to the CTL. Bar diagrams represent the quantification of phosphorylated protein relative to the total protein. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to CTL. # $p < 0.05$ and ### $p < 0.001$ compared to cells treated with Ang II alone.

Figure 4. Ang II-induced HDAC5 nuclear export is mediated by the PI3K/Akt and not ERK1/2 pathway in A10 VSMCs.

Serum-starved VSMCs were pre-treated with U0126 (MEK1/2 inhibitor), wortmannin (PI3K inhibitor) or SC66 (Akt inhibitor) for 30 min, prior to Ang II stimulation for 15 min. Cells were fixed and stained with anti-HDAC5 antibody (green signal) and nuclei were stained with DAPI (blue signal).

Figure 5. Ang II-induced Egr-1 expression is mediated by the Akt pathway in A10 VSMCs.

Serum-starved VSMCs were pre-treated with SC66 **(A)** for 30 min or cells were transfected with Akt siRNA or scrambled siRNA **(B)** for 48h, prior to stimulation with 100 nM Ang II for 60 min. Cell lysates were immunoblotted with Egr-1, Akt and β -tubulin antibodies. The control is taken as 1 and each value aside is expressed as fold of increase compare to the CTL. Bar diagrams represent the quantification of Egr-1 relative to β -tubulin. *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ compared to CTL. #### $p < 0.0001$ and ##### $p < 0.0001$ compared to cells treated with Ang II alone.

Figure 6. Inhibition of HDAC5 reduces Ang II-induced Egr-1 expression in A10 VSMCs.

Serum-starved VSMCs were incubated with MC1568 **(A)** or TMP-195 **(B)** (class IIa HDAC inhibitors) for 24 hours or cells were transfected with HDAC5 siRNA or scrambled siRNA **(C)** for 48h, prior to stimulation with 100 nM Ang II for 60 min. Cell lysates were immunoblotted with Egr-1, HDAC5 and β -tubulin antibodies. The control is taken as 1 and each value aside is expressed as fold of increase compare to the CTL. Bar diagrams represent the quantification of Egr-1 relative to β -tubulin. *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ compared to CTL. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ and ##### $p < 0.0001$ compared to cells treated with Ang II alone.

Figure 7. Inhibition of the nuclear export of HDAC5 attenuates Ang II-induced Egr-1 expression in A10 VSMCs.

Serum-starved VSMCs were incubated with leptomycin B (LMB) or KPT-330 (nuclear transport inhibitors) for 4 hours prior to Ang II stimulation for 15 min. Cells were fixed and stained with anti-HDAC5 antibody (green signal) and nuclei were stained with DAPI (blue signal) **(A)**. Serum-starved VSMCs were incubated with LMB **(B)** or KPT-330 **(C)** for 24 hours, prior to stimulation with 100 nM Ang II for 60 min. Cell lysates were immunoblotted with Egr-1 and β -tubulin

antibodies. The control is taken as 1 and each value aside is expressed as fold of increase compare to the CTL. Bar diagrams represent the quantification of Egr-1 relative to β -tubulin. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to CTL. ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ compared to cells treated with Ang II alone.

Figure 8. Silencing HDAC5 or Egr-1 inhibits Ang II-induced cell hypertrophy.

Cells were transfected with HDAC5 siRNA **(A)**, Egr-1 siRNA **(B)** or scrambled siRNA for 48h, prior to stimulation with Ang II for 24h. Cells were fixed and stained with HCS CellMask™ Green Stain. Bar diagrams represent the quantification of cell volume. **** $p < 0.0001$ compared to scrambled siRNA control and #### $p < 0.0001$ compared to cells treated with Ang II.

Figure 9. Schematic model of the involvement of the PI3K/Akt pathway in Ang II-induced HDAC5 phosphorylation and its nuclear export and Egr-1 expression in rat VSMCs.

Ang II binds to its G-protein coupled receptor and activates the ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. Among the two pathways, only PI3K/Akt pathway is involved in Ang II-induced HDAC5 phosphorylation and its nuclear export. The phosphorylation and nuclear exclusion of HDAC5 regulate the expression of Egr-1 in response to Ang II via the Akt pathway. HDAC5/Egr-1-dependent signaling is required for Ang II-induced VSMC hypertrophy.

7. Acknowledgments

This work was supported by funding from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to Ashok K. Srivastava.

8. Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

9. Author contributions

V.T. conducted all the experiments, analyzed the data and drafted the manuscript. A.J. conducted and analyzed the experiments related to hypertrophy. M.B.A.S. discussed the results and revised the manuscript. A.K.S designed the study, discussed the results, and revised the paper with V.T., A.J. and M.B.A.S. All authors approved on the final version before submission.

10. References

1. Renna, N. F., de Las Heras, N., and Miatello, R. M. (2013) Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int J Hypertens* 2013, 808353
2. Intengan, H. D., and Schiffrin, E. L. (2001) Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 38, 581-587
3. Hao, H., Gabbiani, G., and Bochaton-Piallat, M. L. (2003) Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1510-1520
4. Rensen, S. S., Doevendans, P. A., and van Eys, G. J. (2007) Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* 15, 100-108
5. Wu, C.-H., Mohammadmoradi, S., Chen, J. Z., Sawada, H., Daugherty, A., and Lu, H. S. (2018) Renin-angiotensin system and cardiovascular functions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 38, e108-e116
6. Nicholls, M. G., Richards, A. M., and Agarwal, M. (1998) The importance of the renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *J Hum Hypertens* 12, 295-299
7. Mehta, P. K., and Griendling, K. K. (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C82-97
8. Touyz, R. M. (2003) The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 5, 155-164
9. Schmidt-Ott, K. M., Kagiya, S., and Phillips, M. I. (2000) The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. *Regul Pept* 93, 65-77
10. Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (2000) Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 52, 639-672
11. Forrester, S. J., Booz, G. W., Sigmund, C. D., Coffman, T. M., Kawai, T., Rizzo, V., Scalia, R., and Eguchi, S. (2018) Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* 98, 1627-1738

12. Cheyou, E. R., Youreva, V., and Srivastava, A. K. (2014) Involvement of the early growth response protein 1 in vascular pathophysiology: an overview. *Indian J Biochem Biophys* 51, 457-466
13. Silverman, E. S., and Collins, T. (1999) Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology. *Am J Pathol* 154, 665-670
14. Bouallegue, A., Simo Cheyou, E. R., Anand-Srivastava, M. B., and Srivastava, A. K. (2013) ET-1-induced growth promoting responses involving ERK1/2 and PKB signaling and Egr-1 expression are mediated by Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase-II in vascular smooth muscle cells. *Cell Calcium* 54, 428-435
15. Youreva, V., and Srivastava, A. K. (2016) Early Growth Response Protein-1 Expression by Insulin-Like Growth Factor-1 Requires ROS-Dependent Activation of ERK1/2 and PKB Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Cell Biochem* 117, 152-162
16. Simo-Cheyou, E. R., Tan, J. J., Grygorczyk, R., and Srivastava, A. K. (2017) STIM-1 and ORAI-1 channel mediate angiotensin-II-induced expression of Egr-1 in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 232, 3496-3509
17. Rondeau, V., Jain, A., Truong, V., and Srivastava, A. K. (2019) Involvement of the Akt-dependent CREB signaling pathway in hydrogen-peroxide-induced early growth response protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cells (1). *Can J Physiol Pharmacol* 97, 885-892
18. Harja, E., Bucciarelli, L. G., Lu, Y., Stern, D. M., Zou, Y. S., Schmidt, A. M., and Yan, S. F. (2004) Early growth response-1 promotes atherogenesis: mice deficient in early growth response-1 and apolipoprotein E display decreased atherosclerosis and vascular inflammation. *Circ Res* 94, 333-339
19. Khachigian, L. M. (2006) Early growth response-1 in cardiovascular pathobiology. *Circ Res* 98, 186-191
20. McCaffrey, T. A., Fu, C., Du, B., Eksinar, S., Kent, K. C., Bush, H., Jr., Kreiger, K., Rosengart, T., Cybulsky, M. I., Silverman, E. S., and Collins, T. (2000) High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis. *J Clin Invest* 105, 653-662

21. Kapakos, G., Youreva, V., and Srivastava, A. K. (2012) Attenuation of endothelin-1-induced PKB and ERK1/2 signaling, as well as Egr-1 expression, by curcumin in A-10 vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* 90, 1277-1285
22. Simo-Cheyou, E. R., Youreva, V., and Srivastava, A. K. (2017) cAMP attenuates angiotensin-II-induced Egr-1 expression via PKA-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* 95, 928-937
23. Youreva, V., Kapakos, G., and Srivastava, A. K. (2013) Insulin-like growth-factor-1-induced PKB signaling and Egr-1 expression is inhibited by curcumin in A-10 vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* 91, 241-247
24. Seto, E., and Yoshida, M. (2014) Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a018713
25. Verdin, E., Dequiedt, F., and Kasler, H. G. (2003) Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* 19, 286-293
26. Wright, L. H., and Menick, D. R. (2016) A class of their own: exploring the nondeacetylase roles of class IIa HDACs in cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 311, H199-206
27. Xu, X., Ha, C.-H., Wong, C., Wang, W., Hausser, A., Pfizenmaier, K., Olson, E. N., McKinsey, T. A., and Jin, Z.-G. (2007) Angiotensin II stimulates protein kinase D-dependent histone deacetylase 5 phosphorylation and nuclear export leading to vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 2355-2362
28. Ginnan, R., Sun, L. Y., Schwarz, J. J., and Singer, H. A. (2012) MEF2 is regulated by CaMKII δ 2 and a HDAC4–HDAC5 heterodimer in vascular smooth muscle cells. *Biochemical Journal* 444, 105-114
29. Yang, X. J., and Gregoire, S. (2005) Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Mol Cell Biol* 25, 2873-2884
30. Grozinger, C. M., and Schreiber, S. L. (2000) Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7835-7840

31. Suzuki, E., Satonaka, H., Nishimatsu, H., Oba, S., Takeda, R., Omata, M., Fujita, T., Nagai, R., and Hirata, Y. (2004) Myocyte enhancer factor 2 mediates vascular inflammation via the p38-dependent pathway. *Circ Res* 95, 42-49
32. Potthoff, M. J., and Olson, E. N. (2007) MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* 134, 4131-4140
33. Chen, X., Gao, B., Ponnusamy, M., Lin, Z., and Liu, J. (2017) MEF2 signaling and human diseases. *Oncotarget* 8, 112152-112165
34. Mai, A., Massa, S., Pezzi, R., Simeoni, S., Rotili, D., Nebbioso, A., Scognamiglio, A., Altucci, L., Loidl, P., and Brosch, G. (2005) Class II (IIa)-selective histone deacetylase inhibitors. 1. Synthesis and biological evaluation of novel (aryloxopropenyl)pyrrolyl hydroxyamides. *J Med Chem* 48, 3344-3353
35. Lobera, M., Madauss, K. P., Pohlhaus, D. T., Wright, Q. G., Trocha, M., Schmidt, D. R., Baloglu, E., Trump, R. P., Head, M. S., Hofmann, G. A., Murray-Thompson, M., Schwartz, B., Chakravorty, S., Wu, Z., Mander, P. K., Kruidenier, L., Reid, R. A., Burkhart, W., Turunen, B. J., Rong, J. X., Wagner, C., Moyer, M. B., Wells, C., Hong, X., Moore, J. T., Williams, J. D., Soler, D., Ghosh, S., and Nolan, M. A. (2013) Selective class IIa histone deacetylase inhibition via a nonchelating zinc-binding group. *Nat Chem Biol* 9, 319-325
36. Sun, Q., Chen, X., Zhou, Q., Burstein, E., Yang, S., and Jia, D. (2016) Inhibiting cancer cell hallmark features through nuclear export inhibition. *Signal Transduct Target Ther* 1, 16010
37. Kazim, S., Malafa, M. P., Coppola, D., Husain, K., Zibadi, S., Kashyap, T., Crochiere, M., Landesman, Y., Rashal, T., Sullivan, D. M., and Mahipal, A. (2015) Selective Nuclear Export Inhibitor KPT-330 Enhances the Antitumor Activity of Gemcitabine in Human Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Ther* 14, 1570-1581
38. Berk, B. C., and Rao, G. N. (1993) Angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy: PDGF A-chain mediates the increase in cell size. *Journal of cellular physiology* 154, 368-380
39. Geisterfer, A., Peach, M. J., and Owens, G. K. (1988) Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circulation research* 62, 749-756

40. Ohtsu, H., Higuchi, S., Shirai, H., Eguchi, K., Suzuki, H., Hinoki, A., Brailoiu, E., Eckhart, A. D., Frank, G. D., and Eguchi, S. (2008) Central role of Gq in the hypertrophic signal transduction of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 149, 3569-3575
41. Yoshida, T., Gan, Q., and Owens, G. K. (2008) Kruppel-like factor 4, Elk-1, and histone deacetylases cooperatively suppress smooth muscle cell differentiation markers in response to oxidized phospholipids. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 295, C1175-C1182
42. Usui, T., Morita, T., Okada, M., and Yamawaki, H. (2014) Histone deacetylase 4 controls neointimal hyperplasia via stimulating proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 63, 397-403
43. Santiago, F. S., Lowe, H. C., Kavurma, M. M., Chesterman, C. N., Baker, A., Atkins, D. G., and Khachigian, L. M. (1999) New DNA enzyme targeting Egr-1 mRNA inhibits vascular smooth muscle proliferation and regrowth after injury. *Nat Med* 5, 1264-1269

Chapitre 3 – Discussion générale

L'Ang II est un puissant médiateur du remodelage vasculaire associé à la progression des MCVs telles que l'athérosclérose et l'hypertension (12). Ce remodelage vasculaire est caractérisé par un changement phénotypique des CMLVs qui promeut la prolifération, la migration, la survie, la différenciation et l'hypertrophie cellulaire aboutissant à la formation néointimale (9,10). Ces changements sont effectués, entre autres, par l'activation des voies MAPK et PI3K/Akt induites par l'Ang II (13,40). Les HDACs sont reconnues pour désacétyler les résidus lysines des histones et protéines non-histones et celles-ci régulent l'expression des gènes impliqués dans la croissance et l'hypertrophie cellulaire par leur liaison aux facteurs de transcription. De plus, l'Ang II stimule la phosphorylation de la classe IIa des HDACs, particulièrement les HDAC4 et HDAC5, et leur élévation est remarquée dans les MCVs (203,216,218,223). La phosphorylation et l'export nucléaire de ces HDACs induits par une variété de kinases enlèvent la répression sur la transcription de gènes (192,203). Le rôle de la PKC, PKD et CaMKII induites par l'Ang II est rapporté dans la phosphorylation des HDAC5 dans les CMLVs. En effet, l'inhibition de ces kinases diminue la phosphorylation, l'exclusion nucléaire des HDAC5, ainsi que la transcription des gènes prolifératifs et hypertrophiques (218,223). En sachant que l'Ang II active les kinases ERK1/2, PI3K et Akt (13,40) et que leur implication dans la phosphorylation des HDAC5 est inexplorée, nous avons donc investigué le rôle de ces kinases dans la régulation des HDAC5 dans les CMLVs.

Cette étude démontre que l'ERK1/2, la kinase la plus étudiée parmi les MAPK, ne contribue ni à la phosphorylation ni à l'export nucléaire des HDAC5 induits par l'Ang II dans les CMLVs. Au contraire, la voie PI3K/Akt est impliquée dans la phosphorylation et l'exclusion nucléaire des HDAC5 en réponse à une stimulation de l'Ang II dans les CMLVs. Le blocage de la PI3K par wortmannin, l'Akt par SC66 ou le KD de l'Akt par siRNA a atténué la phosphorylation ainsi que l'export des HDAC5 au cytoplasme induits par l'Ang II. Les HDAC5 phosphorylées sont alors exportées hors du noyau à la suite de la liaison des protéines chaperonnes 14-3-3 (211). Vu que l'Akt régule la phosphorylation des HDAC5 et qu'une suractivation de ces HDACs est liée aux anomalies vasculaires (203,206), une amélioration de ces conditions pathologiques pourrait être

observée lors de l'inhibition de cette kinase. En effet, une suppression de l'expression de l'Akt réduit la prolifération et l'hypertrophie cellulaire dans des modèles animaux hypertendus (96,100-102). Par contre, le mécanisme précis par lequel l'Akt phosphoryle les HDAC5 reste à investiguer. Des études antérieures ont rapporté l'importation nucléaire de l'Akt induite par des facteurs de croissance, comme le PDGF et le *nerve growth factor*, dans différents types cellulaires (249,250). Il est donc possible que l'Akt nucléaire participe à la phosphorylation des HDAC5 dans les CMLVs.

Dans les MCVs, une augmentation de la transcription de gènes liés à la migration, la prolifération, et la croissance cellulaire est observée (135,137,251,252). L'Egr-1 est peu détectable dans des conditions physiologiques. Toutefois lors des dommages vasculaires, le niveau d'Egr-1 et les gènes régulateurs du cycle cellulaire régulés par l'Egr-1 augmentent significativement (140,167,169,170). L'inhibition de l'Egr-1 empêche la croissance et la prolifération des cellules musculaires lisses dans les lésions athérosclérotiques (161,167,169,170). Nous avons rapporté que l'Ang II est un puissant activateur de l'Egr-1. De plus, nous avons montré que l'IGF-1 induit l'expression de l'Egr-1 à travers la voie Akt dans les CMLVs (160). Étant donné que l'Ang II active aussi la voie Akt, la contribution de celle-ci dans l'expression de l'Egr-1 a été explorée. Nous avons observé une diminution de l'expression de l'Egr-1 induite lors du blocage de l'Akt dans les CMLVs stimulées par l'Ang II. La kinase Akt est également impliquée dans l'expression de l'Egr-1 induit par le H₂O₂, un dérivé stable des ROS produit par le stress oxydatif, et l'Ang II est un producteur de H₂O₂ par la voie oxydase NADPH/NADH (13,110,155). Les voies de signalisation du stress oxydatif pourraient contribuer à la phosphorylation et l'exclusion nucléaire des HDAC5 qui réguleraient par la suite l'expression de l'Egr-1 dans les CMLVs.

La voie Akt contribue d'une part à l'activation des HDAC5 et d'autre part à l'expression de l'Egr-1. Malgré la contribution cruciale de ces effecteurs dans le remodelage vasculaire sous des conditions pathophysiologiques, la régulation de l'Egr-1 par des HDAC5 dans les CMLVs reste inexplorée. Dans cette étude, nous avons établi pour la première fois une relation entre les HDAC5 et l'Egr-1. L'inhibition pharmacologique des HDAC5 par MC1568, TMP-195 ou le KD des

HDAC5 par siRNA atténue l'expression de l'Egr-1 induite par l'Ang II. De plus, l'inhibition des HDAC5 a eu un effet répressif sur l'activité transcriptionnelle de MEF2, un membre de la famille des facteurs de transcription *MADS-box* qui induit la transcription de gènes prolifératifs et hypertrophiques (218,223). Ceci suggère que les HDAC5 sont des médiateurs en amont des facteurs de transcription, tel que l'Egr-1, qui promeuvent le remodelage vasculaire. Par ailleurs, l'inhibition des HDAC5 par MC1568 améliore les fonctions vasculaires en réduisant l'hyperplasie néointimale et la pression sanguine élevée dans différents modèles murins (233,243). L'inhibiteur de la classe IIa des HDACs découvert dernièrement, TMP-195, est exploré dans la recherche contre le cancer du sein. L'administration du TMP-195 diminue la taille des tumeurs et la métastase pulmonaire (253,254).

La localisation nucléaire de la classe IIa des HDACs a un rôle crucial sur la transcription de divers gènes (203,206). Le blocage de l'export nucléaire des HDAC5 cause une accumulation de celles-ci dans le noyau ayant alors comme résultat de réprimer la transcription de gènes liés à la prolifération, la migration et l'hypertrophie des CMLVs (204). Nous avons montré que le traitement des CMLVs avec des inhibiteurs de l'export nucléaire, LMB ou KPT-330, a effectivement réduit l'expression de l'Egr-1 induite par l'Ang II. De plus, une étude a montré récemment qu'un prétraitement des cardiomyocytes avec du KPT-330 a diminué l'hypertrophie induite par l'Ang II (255). Le potentiel des inhibiteurs de l'export nucléaire est peu exploré dans les MCVs, mais leur apport bénéfique dans le domaine oncologique a été prouvé. L'utilisation de la LMB ou du KPT-330 a diminué l'expression des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs, comme p21, p53 et *forkhead box protein O* (FOXO) (256,257). Par ailleurs, le composé KPT-330 est en étude clinique pour le traitement des tumeurs solides ainsi que pour des études en hématologie humaine (256). Bref, la régulation des facteurs de transcription par les HDAC5 est contrôlée par leur phosphorylation et leur export nucléaire et une atténuation de l'une de ces deux actions préviendrait la transcription de gènes associés au développement des MCVs.

Finalement, cette étude a démontré un effet anti-hypertrophique lors du KD de l'expression des HDAC5 ou de l'Egr-1 dans les CMLVs stimulées par l'Ang II. Ceci pourrait suggérer que la capacité des inhibiteurs des HDACs à réprimer l'expression de l'Egr-1 et l'hypertrophie induites

par l'Ang II pourrait être en partie responsable de l'amélioration des anomalies vasculaires, tel qu'observée dans des études antérieures utilisant des inhibiteurs des HDACs (203,233,258). Bien entendu, une meilleure compréhension de la signalisation des HDAC5 et de leur contribution dans la régulation de divers facteurs de transcription liés aux MCVs mèneraient au développement de nouvelles thérapies efficaces grâce à des inhibiteurs des HDAC5 ou des inhibiteurs d'exportation nucléaire.

Modèle expérimental

Dans cette étude, le modèle expérimental utilisé est les CMLVs A10 qui sont dérivées de l'aorte thoracique de rats embryonnaires. Ce modèle est extensivement exploité pour étudier les événements cellulaires du système vasculaire (142,259-262). De plus, ces cellules se maintiennent facilement en culture cellulaire et leur taux de succès de transfection avec des siRNA est extrêmement élevé. Ces cellules ont également des propriétés comparables à des cultures primaires de CMVLs extraites de l'aorte de rats adultes (259). En effet, nous avons observé que les CMLVs A10 et les CMLVs dérivées de la paroi aortique des rats adultes Sprague-Dawley ont exhibé des réponses similaires à la suite d'une stimulation avec de l'Ang II. Par exemple, l'inhibition de la voie Akt, et non la voie ERK1/2, a atténué la phosphorylation des HDAC5 en réponse à l'Ang II dans les CMLVs Sprague-Dawley (**Figures S1 et S2**, en Annexes). La suppression des HDAC5 par siRNA dans ces cellules a aussi diminué l'expression de l'Egr-1 induite par l'Ang II (**Figure S3**, en Annexes), comme observé dans les CMLVs A10.

D'ailleurs, l'utilisation des CMLVs isolées des vaisseaux sanguins de sujets humains sains et atteints d'une maladie vasculaire serait envisageable afin d'étudier si ces événements intracellulaires présents dans les CMLVs A10 et Sprague-Dawley sont aussi activés chez les humains. Ceci permettrait de renforcer les découvertes associées à cette étude.

Perspectives de l'étude

Une suractivation des voies signalétiques induite par l'Ang II et une élévation de la phosphorylation des HDAC5 participent au remodelage vasculaire, tel que par l'augmentation de la taille, croissance et migration des CMLVs (12,218,223). Nous avons montré que la délétion

des HDAC5 a diminué l'hypertrophie en réponse à l'Ang II, mais l'étude de la suppression de ces HDACs sur la prolifération et la migration cellulaires n'a pas été explorée. Il serait donc intéressant d'examiner l'effet de la délétion des HDAC5 sur la prolifération et la migration induites par l'Ang II dans les CMLVs. D'une part, la technique du marquage au bromodésoxyuridine (BrdU) et le niveau d'expression du *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) peuvent être utilisés pour évaluer la prolifération cellulaire (263). D'autre part, la méthode du test de grattage (*scratch assay*) peut être envisagée pour étudier la migration des CMLVs (264).

Des expériences effectuées plus récemment dans notre laboratoire montrent une élévation de la phosphorylation des HDAC5 chez les rats SHR comparés aux rats WKY (résultat préliminaire non présenté). Par conséquent, pour prouver davantage le rôle des HDAC5 dans la pathogenèse de l'hypertension, il serait intéressant d'utiliser un modèle murin avec la délétion génétique en HDAC5 (HDAC5^{-/-}) et d'examiner si ces animaux seraient protégés par une augmentation de la pression sanguine induite par l'Ang II.

Chapitre 4 – Conclusion

En somme, cette étude montre que l'Ang II induit la phosphorylation et l'export nucléaire des HDAC5 via la voie PI3K/Akt et non ERK1/2 dans les CMLVs. Le blocage des kinases PI3K et Akt a atténué la phosphorylation et l'exclusion nucléaire des HDAC5, contrairement à l'inhibition de l'ERK1/2 qui n'a eu aucun effet. De plus, les HDAC5 régulent l'expression du facteur de transcription Egr-1 par la voie Akt et contribuent à l'hypertrophie vasculaire. D'une part, l'inhibition de l'Akt a diminué l'expression de l'Egr-1 induite par l'Ang II. D'autre part, l'inhibition ou le KD des HDAC5 ainsi que le blocage de leur export nucléaire ont réduit l'expression de l'Egr-1 dans les CMLVs stimulées par l'Ang II (**Figure 11**).

La contribution individuelle de l'Akt, des HDAC5 ou de l'Egr-1 a été rapportée dans le développement des MCVs (96,140,203). Les résultats de cette étude ont mis en évidence une relation importante entre les HDAC5 et l'Egr-1 par la voie Akt dans l'hypertrophie vasculaire. Des études plus approfondies seront nécessaires pour clarifier les événements par lesquels les HDAC5 régulent l'expression de l'Egr-1 en réponse à l'Ang II et pour établir le rôle potentiel des inhibiteurs de la classe IIa des HDACs à des fins de traitement des MCVs.

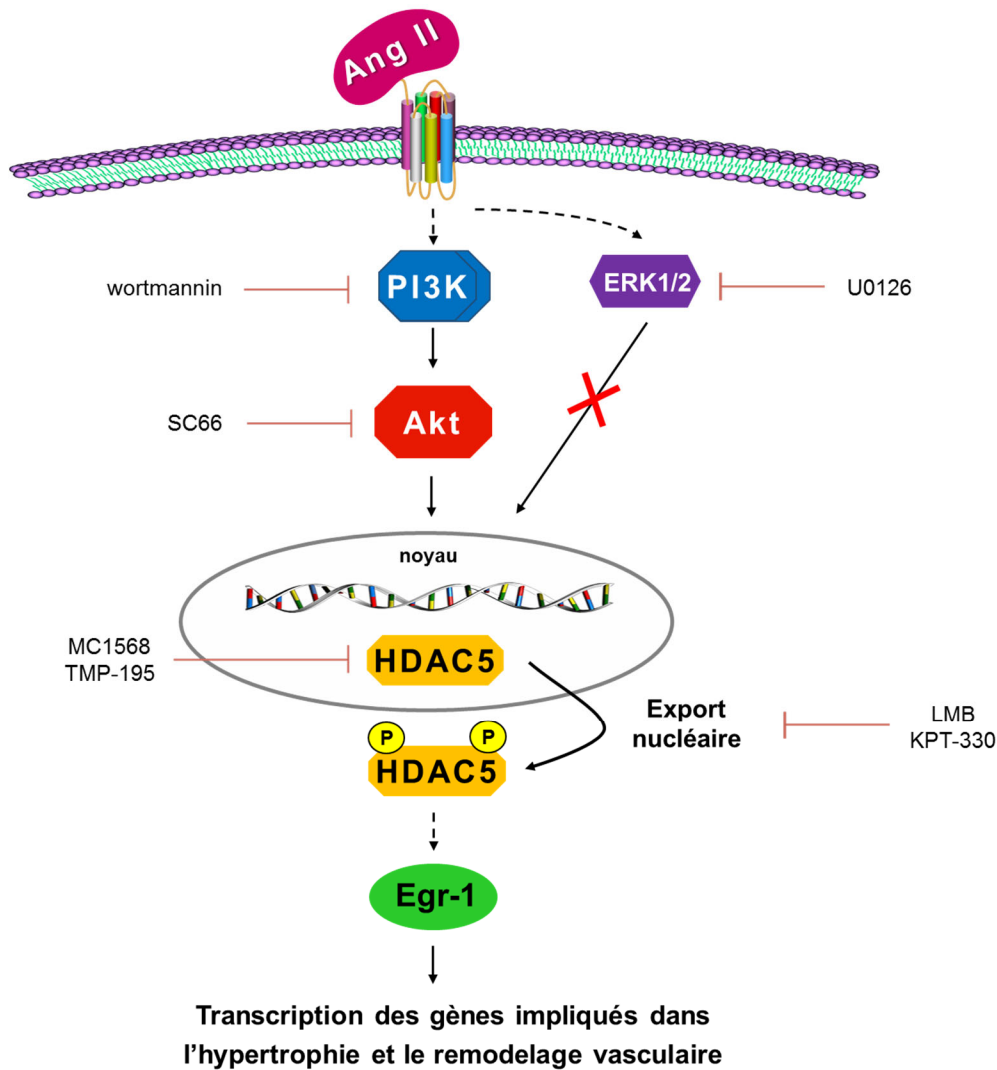


Figure 11. – Modèle schématisé de la contribution de la voie PI3K/Akt dans la phosphorylation et l'export nucléaire des HDAC5 ainsi que dans l'expression de l'Egr-1 induite par l'Ang II dans les cellules musculaires lisses vasculaires

L'Ang II phosphoryle et exporte les HDAC5 hors du noyau, ce qui induit l'activation de l'Egr-1 par la voie PI3K/Akt, contribuant ainsi à l'hypertrophie et au remodelage vasculaire. L'inhibition de la PI3K par wortmannin et celle de l'Akt par SC66 ont diminué la phosphorylation et l'export nucléaire des HDAC5 induits par l'Ang II. L'inhibition de l'ERK1/2 par U0126 n'a pas d'effet sur ces actions. L'inhibition des HDAC5 par MC1568 et TMP-195 ainsi que le blocage de l'export nucléaire par LMB et KPT-330 ont atténué l'expression de l'Egr-1 dans les CMLVs stimulées par l'Ang II. L'activation des HDAC5 et de l'Egr-1 mène à la transcription de gènes impliqués dans les anomalies vasculaires.

Références bibliographiques

1. Organization, W. H. (2017) Cardiovascular diseases (CVDs) fact sheet. *World Health Organization*
2. Force, U. S. P. S. T., Curry, S. J., Krist, A. H., Owens, D. K., Barry, M. J., Caughey, A. B., Davidson, K. W., Doubeni, C. A., Epling, J. W., Jr., Kemper, A. R., Kubik, M., Landefeld, C. S., Mangione, C. M., Silverstein, M., Simon, M. A., Tseng, C. W., and Wong, J. B. (2018) Risk Assessment for Cardiovascular Disease With Nontraditional Risk Factors: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA* **320**, 272-280
3. Stewart, J., Manmathan, G., and Wilkinson, P. (2017) Primary prevention of cardiovascular disease: A review of contemporary guidance and literature. *JRSM Cardiovasc Dis* **6**, 2048004016687211
4. Owens, G. K., Kumar, M. S., and Wamhoff, B. R. (2004) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* **84**, 767-801
5. Marieb, E. N., Hoehn, K., Moussakova, L., and Lachaine, R. (2010) Anatomie et physiologie humaines (4e éd.). *Saint-Laurent (QC), éditions du Renouveau pédagogique*, 802-811
6. Pugsley, M. K., and Tabrizchi, R. (2000) The vascular system. An overview of structure and function. *J Pharmacol Toxicol Methods* **44**, 333-340
7. Zaromitidou, M., Siasos, G., Papageorgiou, N., Oikonomou, E., and Tousoulis, D. (2016) Atherosclerosis and coronary artery disease: from basics to genetics. in *Cardiovascular Diseases*, Elsevier. pp 3-24
8. Thakali, K. M., Galligan, J. J., Fink, G. D., and Watts, S. W. (2007) Arterial and venous function in hypertension. *Comprehensive Hypertension. Edinburgh, United Kingdom: Elsevier*, 205-222
9. Rensen, S. S., Doevendans, P. A., and van Eys, G. J. (2007) Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* **15**, 100-108
10. Hao, H., Gabbiani, G., and Bochaton-Piallat, M. L. (2003) Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1510-1520
11. Hahn, A. W., Resink, T. J., Kern, F., and Buhler, F. R. (1993) Peptide vasoconstrictors, vessel structure, and vascular smooth-muscle proliferation. *J Cardiovasc Pharmacol* **22 Suppl 5**, S37-43
12. Forrester, S. J., Booz, G. W., Sigmund, C. D., Coffman, T. M., Kawai, T., Rizzo, V., Scalia, R., and Eguchi, S. (2018) Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* **98**, 1627-1738
13. Mehta, P. K., and Griendling, K. K. (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C82-97
14. Davis-Dusenbery, B. N., Wu, C., and Hata, A. (2011) Micromanaging vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 2370-2377
15. Tigerstedt, R., and Bergman, P. (1898) Niere und Kreislauf, skandinav. *Arch Physiol* **8**, 223-271

16. Basso, N., and Terragno, N. A. (2001) History about the discovery of the renin-angiotensin system. *Hypertension* **38**, 1246-1249
17. Page, I. H., and Helmer, O. M. (1940) A Crystalline Pressor Substance (Angiotonin) Resulting from the Reaction between Renin and Renin-Activator. *J Exp Med* **71**, 29-42
18. Braun-Menendez, E., Fasciolo, J. C., Leloir, L. F., and Munoz, J. M. (1940) The substance causing renal hypertension. *J Physiol* **98**, 283-298
19. Braun-Menendez, E., and Page, I. H. (1958) A Suggested Revision of Nomenclature—Angiotensin. *Nature* **181**, 1061
20. Skeggs, L. T., Jr., Marsh, W. H., Kahn, J. R., and Shumway, N. P. (1954) The existence of two forms of hypertensin. *J Exp Med* **99**, 275-282
21. Skeggs, L. T., Jr., Marsh, W. H., Kahn, J. R., and Shumway, N. P. (1954) The purification of hypertensin I. *J Exp Med* **100**, 363-370
22. Skeggs, L. T., Jr., Kahn, J. R., Lentz, K., and Shumway, N. P. (1957) The preparation, purification, and amino acid sequence of a polypeptide renin substrate. *J Exp Med* **106**, 439-453
23. Skeggs, L. T., Jr., Lentz, K. E., Kahn, J. R., Shumway, N. P., and Woods, K. R. (1956) The amino acid sequence of hypertensin. II. *J Exp Med* **104**, 193-197
24. Fei, D. T., Coghlan, J. P., Fernley, R. T., Scoggins, B. A., and Tregear, G. W. (1980) Peripheral production of angiotensin II and III in sheep. *Circ Res* **46**, 1135-137
25. Fyhrquist, F., Metsärinne, K., and Tikkanen, I. (1995) Role of angiotensin II in blood pressure regulation and in the pathophysiology of cardiovascular disorders. *Journal of human hypertension* **9**, S19-24
26. Wu, C., Lu, H., Cassis, L. A., and Daugherty, A. (2011) Molecular and Pathophysiological Features of Angiotensinogen: A Mini Review. *N Am J Med Sci (Boston)* **4**, 183-190
27. Lu, H., Cassis, L. A., Kooi, C. W., and Daugherty, A. (2016) Structure and functions of angiotensinogen. *Hypertens Res* **39**, 492-500
28. Streatfeild-James, R. M., Williamson, D., Pike, R. N., Tewksbury, D., Carrell, R. W., and Coughlin, P. B. (1998) Angiotensinogen cleavage by renin: importance of a structurally constrained N-terminus. *FEBS Lett* **436**, 267-270
29. Corvol, P., Williams, T. A., and Soubrier, F. (1995) Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme. *Methods Enzymol* **248**, 283-305
30. Lavoie, J. L., and Sigmund, C. D. (2003) Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* **144**, 2179-2183
31. Sparks, M. A., Crowley, S. D., Gurley, S. B., Mirosou, M., and Coffman, T. M. (2014) Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol* **4**, 1201-1228
32. Arora, P. K., and Chauhan, A. (2013) ACE inhibitors: a comprehensive review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **4**, 532
33. Lonn, E. M., Yusuf, S., Jha, P., Montague, T. J., Teo, K. K., Benedict, C. R., and Pitt, B. (1994) Emerging role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac and vascular protection. *Circulation* **90**, 2056-2069
34. Borer, J. S. (2007) Angiotensin-converting enzyme inhibition: a landmark advance in treatment for cardiovascular diseases. *European Heart Journal Supplements* **9**, E2-E9

35. Tikellis, C., and Thomas, M. C. (2012) Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Is a Key Modulator of the Renin Angiotensin System in Health and Disease. *Int J Pept* **2012**, 256294
36. Santos, R. A., Simoes e Silva, A. C., Maric, C., Silva, D. M., Machado, R. P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S. V., Lopes, M. T., Bader, M., Mendes, E. P., Lemos, V. S., Campagnole-Santos, M. J., Schultheiss, H. P., Speth, R., and Walther, T. (2003) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8258-8263
37. Nakamoto, H., Ferrario, C. M., Fuller, S. B., Robaczewski, D. L., Winicov, E., and Dean, R. H. (1995) Angiotensin-(1-7) and nitric oxide interaction in renovascular hypertension. *Hypertension* **25**, 796-802
38. Tetzner, A., Gebolys, K., Meinert, C., Klein, S., Uhlich, A., Trebicka, J., Villacanas, O., and Walther, T. (2016) G-Protein-Coupled Receptor MrgD Is a Receptor for Angiotensin-(1-7) Involving Adenylyl Cyclase, cAMP, and Phosphokinase A. *Hypertension* **68**, 185-194
39. Chai, S. Y., Fernando, R., Peck, G., Ye, S. Y., Mendelsohn, F. A., Jenkins, T. A., and Albiston, A. L. (2004) The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2728-2737
40. Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (2000) Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* **52**, 639-672
41. Hollenberg, N. K., Fisher, N. D., and Price, D. A. (1998) Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension* **32**, 387-392
42. Takai, S., Shiota, N., Jin, D., and Miyazaki, M. (1998) Functional role of chymase in angiotensin II formation in human vascular tissue. *J Cardiovasc Pharmacol* **32**, 826-833
43. Marieb, E. N., Hoehn, K., Moussakova, L., and Lachaine, R. (2010) Anatomie et physiologie humaines (4e éd.). *Saint-Laurent (QC), éditions du Renouveau pédagogique*, 1163-1171
44. Reid, I. A., Schwartz, J., Ben, L., Maselli, J., and Keil, L. C. (1983) Interactions between vasopressin and the renin-angiotensin system. *Prog Brain Res* **60**, 475-491
45. Michel, M. C., Brunner, H. R., Foster, C., and Huo, Y. (2016) Angiotensin II type 1 receptor antagonists in animal models of vascular, cardiac, metabolic and renal disease. *Pharmacol Ther* **164**, 1-81
46. Ferrario, C. M. (2006) Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **7**, 3-14
47. Viswanathan, M., and Saavedra, J. M. (1994) Angiotensin II receptor subtypes and growth. in *Angiotensin Receptors*, Springer. pp 205-219
48. Li, Y., Li, X. H., and Yuan, H. (2012) Angiotensin II type-2 receptor-specific effects on the cardiovascular system. *Cardiovasc Diagn Ther* **2**, 56-62
49. Wiemer, G., Scholkens, B. A., Wagner, A., Heitsch, H., and Linz, W. (1993) The possible role of angiotensin II subtype AT2 receptors in endothelial cells and isolated ischemic rat hearts. *J Hypertens Suppl* **11**, S234-235

50. Abadir, P. M., Periasamy, A., Carey, R. M., and Siragy, H. M. (2006) Angiotensin II type 2 receptor-bradykinin B2 receptor functional heterodimerization. *Hypertension* **48**, 316-322
51. Lemarie, C. A., and Schiffrin, E. L. (2010) The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **11**, 19-31
52. Garg, U. C., and Hassid, A. (1993) Mechanisms of nitrosothiol-induced antimitogenesis in aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* **237**, 243-249
53. Jeremy, J. Y., Rowe, D., Emsley, A. M., and Newby, A. C. (1999) Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* **43**, 580-594
54. Adachi, Y., Saito, Y., Kishimoto, I., Harada, M., Kuwahara, K., Takahashi, N., Kawakami, R., Nakanishi, M., Nakagawa, Y., Tanimoto, K., Saitoh, Y., Yasuno, S., Usami, S., Iwai, M., Horiuchi, M., and Nakao, K. (2003) Angiotensin II type 2 receptor deficiency exacerbates heart failure and reduces survival after acute myocardial infarction in mice. *Circulation* **107**, 2406-2408
55. Suzuki, J., Iwai, M., Nakagami, H., Wu, L., Chen, R., Sugaya, T., Hamada, M., Hiwada, K., and Horiuchi, M. (2002) Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT1 and AT2 receptors in neointimal formation. *Circulation* **106**, 847-853
56. Metcalfe, B. L., Huentelman, M. J., Parilak, L. D., Taylor, D. G., Katovich, M. J., Knot, H. J., Sumners, C., and Raizada, M. K. (2004) Prevention of cardiac hypertrophy by angiotensin II type-2 receptor gene transfer. *Hypertension* **43**, 1233-1238
57. Falcon, B. L., Stewart, J. M., Bourassa, E., Katovich, M. J., Walter, G., Speth, R. C., Sumners, C., and Raizada, M. K. (2004) Angiotensin II type 2 receptor gene transfer elicits cardioprotective effects in an angiotensin II infusion rat model of hypertension. *Physiol Genomics* **19**, 255-261
58. Singh, K. D., and Karnik, S. S. (2016) Angiotensin Receptors: Structure, Function, Signaling and Clinical Applications. *J Cell Signal* **1**, 1000111
59. Patel, J. M., Martens, J. R., Li, Y. D., Gelband, C. H., Raizada, M. K., and Block, E. R. (1998) Angiotensin IV receptor-mediated activation of lung endothelial NOS is associated with vasorelaxation. *Am J Physiol* **275**, L1061-1068
60. Li, Y. D., Block, E. R., and Patel, J. M. (2002) Activation of multiple signaling modules is critical in angiotensin IV-induced lung endothelial cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**, L707-716
61. Albiston, A. L., McDowall, S. G., Matsacos, D., Sim, P., Clune, E., Mustafa, T., Lee, J., Mendelsohn, F. A., Simpson, R. J., Connolly, L. M., and Chai, S. Y. (2001) Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem* **276**, 48623-48626
62. Ye, S., Chai, S. Y., Lew, R. A., Ascher, D. B., Morton, C. J., Parker, M. W., and Albiston, A. L. (2008) Identification of modulating residues defining the catalytic cleft of insulin-regulated aminopeptidase. *Biochem Cell Biol* **86**, 251-261
63. Albiston, A. L., Diwakarla, S., Fernando, R. N., Mountford, S. J., Yeatman, H. R., Morgan, B., Pham, V., Holien, J. K., Parker, M. W., Thompson, P. E., and Chai, S. Y. (2011) Identification and development of specific inhibitors for insulin-regulated aminopeptidase as a new class of cognitive enhancers. *Br J Pharmacol* **164**, 37-47

64. Wright, J. W., Yamamoto, B. J., and Harding, J. W. (2008) Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: new discoveries and clinical targets. *Prog Neurobiol* **84**, 157-181
65. Tirupula, K. C., Desnoyer, R., Speth, R. C., and Karnik, S. S. (2014) Atypical signaling and functional desensitization response of MAS receptor to peptide ligands. *PLoS One* **9**, e103520
66. Chappell, M. C. (2007) Emerging evidence for a functional angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-MAS receptor axis: more than regulation of blood pressure? *Hypertension* **50**, 596-599
67. Simoes e Silva, A. C., Silveira, K. D., Ferreira, A. J., and Teixeira, M. M. (2013) ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol* **169**, 477-492
68. Santos, R. A., Castro, C. H., Gava, E., Pinheiro, S. V., Almeida, A. P., Paula, R. D., Cruz, J. S., Ramos, A. S., Rosa, K. T., Irigoyen, M. C., Bader, M., Alenina, N., Kitten, G. T., and Ferreira, A. J. (2006) Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension* **47**, 996-1002
69. Rabelo, L. A., Xu, P., Todiras, M., Sampaio, W. O., Buttgerit, J., Bader, M., Santos, R. A., and Alenina, N. (2008) Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction. *J Am Soc Hypertens* **2**, 418-424
70. Karnik, S. S., Singh, K. D., Tirupula, K., and Unal, H. (2017) Significance of angiotensin 1-7 coupling with MAS1 receptor and other GPCRs to the renin-angiotensin system: IUPHAR Review 22. *Br J Pharmacol* **174**, 737-753
71. McKinney, C. A., Fattah, C., Loughrey, C. M., Milligan, G., and Nicklin, S. A. (2014) Angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9): function in cardiac and vascular remodelling. *Clin Sci (Lond)* **126**, 815-827
72. Ushio-Fukai, M., Griendling, K. K., Akers, M., Lyons, P. R., and Alexander, R. W. (1998) Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem* **273**, 19772-19777
73. Ohtsu, H., Suzuki, H., Nakashima, H., Dhobale, S., Frank, G. D., Motley, E. D., and Eguchi, S. (2006) Angiotensin II signal transduction through small GTP-binding proteins: mechanism and significance in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **48**, 534-540
74. Marrero, M. B., Paxton, W. G., Duff, J. L., Berk, B. C., and Bernstein, K. E. (1994) Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **269**, 10935-10939
75. Rao, G. N., Lassegue, B., Alexander, R. W., and Griendling, K. K. (1994) Angiotensin II stimulates phosphorylation of high-molecular-mass cytosolic phospholipase A2 in vascular smooth-muscle cells. *Biochem J* **299 (Pt 1)**, 197-201
76. Ushio-Fukai, M., Alexander, R. W., Akers, M., Lyons, P. R., Lassegue, B., and Griendling, K. K. (1999) Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **55**, 142-149

77. Herring, B. P., El-Mounayri, O., Gallagher, P. J., Yin, F., and Zhou, J. (2006) Regulation of myosin light chain kinase and telokin expression in smooth muscle tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**, C817-827
78. Shin, H. M., Je, H. D., Gallant, C., Tao, T. C., Hartshorne, D. J., Ito, M., and Morgan, K. G. (2002) Differential association and localization of myosin phosphatase subunits during agonist-induced signal transduction in smooth muscle. *Circ Res* **90**, 546-553
79. Ringvold, H. C., and Khalil, R. A. (2017) Protein Kinase C as Regulator of Vascular Smooth Muscle Function and Potential Target in Vascular Disorders. *Adv Pharmacol* **78**, 203-301
80. Imig, J. D. (2016) Epoxyeicosatrienoic Acids and 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid on Endothelial and Vascular Function. *Adv Pharmacol* **77**, 105-141
81. Majed, B. H., and Khalil, R. A. (2012) Molecular mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn. *Pharmacol Rev* **64**, 540-582
82. Griendling, K. K., Sorescu, D., and Ushio-Fukai, M. (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* **86**, 494-501
83. Taniyama, Y., Ushio-Fukai, M., Hitomi, H., Rocic, P., Kingsley, M. J., Pfahnl, C., Weber, D. S., Alexander, R. W., and Griendling, K. K. (2004) Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **287**, C494-C499
84. Sugden, P. H., and Clerk, A. (1997) Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal* **9**, 337-351
85. Eguchi, S., Matsumoto, T., Motley, E. D., Utsunomiya, H., and Inagami, T. (1996) Identification of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. Possible requirement of Gq-mediated p21ras activation coupled to a Ca²⁺/calmodulin-sensitive tyrosine kinase. *J Biol Chem* **271**, 14169-14175
86. Liao, D. F., Monia, B., Dean, N., and Berk, B. C. (1997) Protein kinase C-zeta mediates angiotensin II activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **272**, 6146-6150
87. Liao, D. F., Duff, J. L., Daum, G., Pelech, S. L., and Berk, B. C. (1996) Angiotensin II stimulates MAP kinase kinase kinase activity in vascular smooth muscle cells, Role of Raf. *Circ Res* **79**, 1007-1014
88. Rocic, P., Jo, H., and Lucchesi, P. A. (2003) A role for PYK2 in ANG II-dependent regulation of the PHAS-1-eIF4E complex by multiple signaling cascades in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C1437-1444
89. Touyz, R. M. (2004) Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells - implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* **37**, 1263-1273
90. Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T., and Ichijo, H. (2001) ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* **2**, 222-228
91. Nishida, M., Tanabe, S., Maruyama, Y., Mangmool, S., Urayama, K., Nagamatsu, Y., Takagahara, S., Turner, J. H., Kozasa, T., Kobayashi, H., Sato, Y., Kawanishi, T., Inoue, R., Nagao, T., and Kurose, H. (2005) G α 12/13- and reactive oxygen species-dependent activation of c-Jun NH₂-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase by

- angiotensin receptor stimulation in rat neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem* **280**, 18434-18441
92. Touyz, R. M., Cruzado, M., Tabet, F., Yao, G., Salomon, S., and Schiffrin, E. L. (2003) Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation. *Can J Physiol Pharmacol* **81**, 159-167
 93. Li, F., and Malik, K. U. (2005) Angiotensin II-induced Akt activation through the epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells is mediated by phospholipid metabolites derived by activation of phospholipase D. *J Pharmacol Exp Ther* **312**, 1043-1054
 94. Ohtsu, H., Dempsey, P. J., Frank, G. D., Brailoiu, E., Higuchi, S., Suzuki, H., Nakashima, H., Eguchi, K., and Eguchi, S. (2006) ADAM17 mediates epidermal growth factor receptor transactivation and vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, e133-137
 95. Eguchi, S., Numaguchi, K., Iwasaki, H., Matsumoto, T., Yamakawa, T., Utsunomiya, H., Motley, E. D., Kawakatsu, H., Owada, K. M., Hirata, Y., Marumo, F., and Inagami, T. (1998) Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **273**, 8890-8896
 96. Hers, I., Vincent, E. E., and Tavaré, J. M. (2011) Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* **23**, 1515-1527
 97. Fernandez-Hernando, C., Ackah, E., Yu, J., Suarez, Y., Murata, T., Iwakiri, Y., Prendergast, J., Miao, R. Q., Birnbaum, M. J., and Sessa, W. C. (2007) Loss of Akt1 leads to severe atherosclerosis and occlusive coronary artery disease. *Cell Metab* **6**, 446-457
 98. Ackah, E., Yu, J., Zoellner, S., Iwakiri, Y., Skurk, C., Shibata, R., Ouchi, N., Easton, R. M., Galasso, G., Birnbaum, M. J., Walsh, K., and Sessa, W. C. (2005) Akt1/protein kinase B α is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest* **115**, 2119-2127
 99. Di Lorenzo, A., Fernandez-Hernando, C., Cirino, G., and Sessa, W. C. (2009) Akt1 is critical for acute inflammation and histamine-mediated vascular leakage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 14552-14557
 100. Stabile, E., Zhou, Y. F., Saji, M., Castagna, M., Shou, M., Kinnaird, T. D., Baffour, R., Ringel, M. D., Epstein, S. E., and Fuchs, S. (2003) Akt controls vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo by delaying G1/S exit. *Circ Res* **93**, 1059-1065
 101. Bou Daou, G., Li, Y., and Anand-Srivastava, M. B. (2016) Enhanced expression of G α proteins contributes to the hyperproliferation of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats via MAP kinase- and PI3 kinase-independent pathways. *Can J Physiol Pharmacol* **94**, 49-58
 102. Sarkar, O., Li, Y., and Anand-Srivastava, M. B. (2019) Resveratrol prevents the development of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats through the inhibition of enhanced expression of G α proteins (1). *Can J Physiol Pharmacol* **97**, 872-879
 103. Seshiah, P. N., Weber, D. S., Rocic, P., Valppu, L., Taniyama, Y., and Griendling, K. K. (2002) Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* **91**, 406-413

104. Karathanassis, D., Stahelin, R. V., Bravo, J., Perisic, O., Pacold, C. M., Cho, W., and Williams, R. L. (2002) Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *EMBO J* **21**, 5057-5068
105. Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (1999) Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **34**, 976-982
106. Zafari, A. M., Ushio-Fukai, M., Minieri, C. A., Akers, M., Lassegue, B., and Griendling, K. K. (1999) Arachidonic acid metabolites mediate angiotensin II-induced NADH/NADPH oxidase activity and hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal* **1**, 167-179
107. Touyz, R. M., Chen, X., Tabet, F., Yao, G., He, G., Quinn, M. T., Pagano, P. J., and Schiffrin, E. L. (2002) Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* **90**, 1205-1213
108. Garrido, A. M., and Griendling, K. K. (2009) NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol* **302**, 148-158
109. Griendling, K. K., Ushio-Fukai, M., Lassegue, B., and Alexander, R. W. (1997) Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* **29**, 366-373
110. Zafari, A. M., Ushio-Fukai, M., Akers, M., Yin, Q., Shah, A., Harrison, D. G., Taylor, W. R., and Griendling, K. K. (1998) Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* **32**, 488-495
111. Touyz, R. M. (2003) The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. *Curr Hypertens Rep* **5**, 155-164
112. Schmidt-Ott, K. M., Kagiya, S., and Phillips, M. I. (2000) The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. *Regul Pept* **93**, 65-77
113. Yang, B. C., Phillips, M. I., Mohuczy, D., Meng, H., Shen, L., Mehta, P., and Mehta, J. L. (1998) Increased angiotensin II type 1 receptor expression in hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 1433-1439
114. Wassmann, S., Czech, T., van Eickels, M., Fleming, I., Bohm, M., and Nickenig, G. (2004) Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice. *Circulation* **110**, 3062-3067
115. Mulvany, M. J., and Aalkjaer, C. (1990) Structure and function of small arteries. *Physiol Rev* **70**, 921-961
116. Heagerty, A. M., Aalkjaer, C., Bund, S. J., Korsgaard, N., and Mulvany, M. J. (1993) Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension* **21**, 391-397
117. Kee, H. J., Kim, G. R., Lin, M. Q., Choi, S. Y., Ryu, Y., Jin, L., Piao, Z. H., and Jeong, M. H. (2017) Expression of Class I and Class II a/b Histone Deacetylase is Dysregulated in Hypertensive Animal Models. *Korean Circ J* **47**, 392-400
118. Griffin, S. A., Brown, W. C., MacPherson, F., McGrath, J. C., Wilson, V. G., Korsgaard, N., Mulvany, M. J., and Lever, A. F. (1991) Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* **17**, 626-635

119. Hayakawa, Y., Aoyama, T., Yokoyama, C., Okamoto, C., Komaki, H., Minatoguchi, S., Iwasa, M., Yamada, Y., Kawamura, I., Kawasaki, M., Nishigaki, K., Mikami, A., Suzuki, F., and Minatoguchi, S. (2015) High salt intake damages the heart through activation of cardiac (pro) renin receptors even at an early stage of hypertension. *PLoS One* **10**, e0120453
120. Fan, X., Liu, K., Cui, W., Huang, J., Wang, W., and Gao, Y. (2014) Novel mechanism of intrarenal angiotensin II-induced sodium/proton exchanger 3 expression by losartan in spontaneously hypertensive rats. *Mol Med Rep* **10**, 2483-2488
121. Hu, W. Y., Fukuda, N., and Kanmatsuse, K. (2002) Growth characteristics, angiotensin II generation, and microarray-determined gene expression in vascular smooth muscle cells from young spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* **20**, 1323-1333
122. Simon, G., Illyes, G., and Csiky, B. (1998) Structural vascular changes in hypertension: role of angiotensin II, dietary sodium supplementation, blood pressure, and time. *Hypertension* **32**, 654-660
123. Gibbons, G. H., Pratt, R. E., and Dzau, V. J. (1992) Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* **90**, 456-461
124. Nishijo, N., Takamine, S., Sugiyama, F., Kimoto, K., Taniguchi, K., Horiguchi, H., Ogata, T., Murakami, K., Fukamizu, A., and Yagami, K. (1999) Vascular remodeling in hypertensive transgenic mice. *Exp Anim* **48**, 203-208
125. Chrysant, S. G. (1998) Vascular remodeling: the role of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Am Heart J* **135**, S21-30
126. Cadilhac, M., and Giudicelli, J. F. (1986) Myocardial and vascular effects of perindopril, a new converting enzyme inhibitor, during hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **284**, 114-126
127. Giudicelli, J. F., Freslon, J. L., Glasson, S., and Richer, C. (1980) Captopril and hypertension development in the SHR. *Clin Exp Hypertens* **2**, 1083-1096
128. Richer, C., Doussau, M. P., and Giudicelli, J. F. (1982) MK 421 and prevention of genetic hypertension development in young spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* **79**, 23-29
129. Levy, B. I., Michel, J. B., Salzmann, J. L., Azizi, M., Poitevin, P., Safar, M., and Camilleri, J. P. (1988) Effects of chronic inhibition of converting enzyme on mechanical and structural properties of arteries in rat renovascular hypertension. *Circ Res* **63**, 227-239
130. Sihm, I., Schroeder, A. P., Aalkjaer, C., Holm, M., Morn, B., Mulvany, M., Thygesen, K., and Lederballe, O. (1995) Regression of media-to-lumen ratio of human subcutaneous arteries and left ventricular hypertrophy during treatment with an angiotensin-converting enzyme inhibitor-based regimen in hypertensive patients. *Am J Cardiol* **76**, 38E-40E
131. Rizzoni, D., Porteri, E., Piccoli, A., Castellano, M., Bettoni, G., Muiesan, M. L., Pasini, G., Guelfi, D., Mulvany, M. J., and Agabiti Rosei, E. (1998) Effects of losartan and enalapril on small artery structure in hypertensive rats. *Hypertension* **32**, 305-310
132. Williams, B. (2016) Drug discovery in renin-angiotensin system intervention: past and future. *Ther Adv Cardiovasc Dis* **10**, 118-125

133. Guillevin, L., Lardoux, M. D., and Corvol, P. (1981) Effects of captopril on blood pressure, electrolytes, and certain hormones in hypertension. *Clin Pharmacol Ther* **29**, 699-704
134. Herrera-Acosta, J., Perez-Grovas, H., Fernandez, M., and Arriaga, J. (1985) Enalapril in essential hypertension. *Drugs* **30 Suppl 1**, 35-46
135. Rafieian-Kopaei, M., Setorki, M., Doudi, M., Baradaran, A., and Nasri, H. (2014) Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med* **5**, 927-946
136. Vaccari, C. S., Lerakis, S., Hammoud, R., and Khan, B. V. (2008) Mechanisms of benefit of angiotensin receptor blockers in coronary atherosclerosis. *Am J Med Sci* **336**, 270-277
137. Bennett, M. R., Sinha, S., and Owens, G. K. (2016) Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res* **118**, 692-702
138. Nickenig, G. (2002) Central role of the AT(1)-receptor in atherosclerosis. *J Hum Hypertens* **16 Suppl 3**, S26-33
139. Khachigian, L. M. (2006) Early growth response-1 in cardiovascular pathobiology. *Circ Res* **98**, 186-191
140. Cheyou, E. R., Youreva, V., and Srivastava, A. K. (2014) Involvement of the early growth response protein 1 in vascular pathophysiology: an overview. *Indian J Biochem Biophys* **51**, 457-466
141. Simo-Cheyou, E. R., Youreva, V., and Srivastava, A. K. (2017) cAMP attenuates angiotensin-II-induced Egr-1 expression via PKA-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* **95**, 928-937
142. Simo-Cheyou, E. R., Tan, J. J., Grygorczyk, R., and Srivastava, A. K. (2017) STIM-1 and ORAI-1 channel mediate angiotensin-II-induced expression of Egr-1 in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* **232**, 3496-3509
143. Milbrandt, J. (1987) A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* **238**, 797-799
144. Lau, L. F., and Nathans, D. (1987) Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 1182-1186
145. Lemaire, P., Revelant, O., Bravo, R., and Charnay, P. (1988) Two mouse genes encoding potential transcription factors with identical DNA-binding domains are activated by growth factors in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 4691-4695
146. Lim, R. W., Varnum, B. C., and Herschman, H. R. (1987) Cloning of tetradecanoyl phorbol ester-induced 'primary response' sequences and their expression in density-arrested Swiss 3T3 cells and a TPA non-proliferative variant. *Oncogene* **1**, 263-270
147. Gashler, A., and Sukhatme, V. P. (1995) Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **50**, 191-224
148. Gashler, A. L., Swaminathan, S., and Sukhatme, V. P. (1993) A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor Egr-1. *Mol Cell Biol* **13**, 4556-4571
149. Swirnow, A. H., Apel, E. D., Svaren, J., Severson, B. R., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., and Milbrandt, J. (1998) Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain. *Molecular and cellular biology* **18**, 512-524

150. Svaren, J., Sevetson, B. R., Apel, E. D., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., and Milbrandt, J. (1996) NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Molecular and cellular biology* **16**, 3545-3553
151. Silverman, E. S., Du, J., Williams, A. J., Wadgaonkar, R., Drazen, J. M., and Collins, T. (1998) cAMP-response-element-binding-protein-binding protein (CBP) and p300 are transcriptional co-activators of early growth response factor-1 (Egr-1). *Biochem J* **336** (Pt 1), 183-189
152. Pagel, J. I., and Deindl, E. (2012) Disease progression mediated by egr-1 associated signaling in response to oxidative stress. *Int J Mol Sci* **13**, 13104-13117
153. Silverman, E. S., and Collins, T. (1999) Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology. *Am J Pathol* **154**, 665-670
154. Khachigian, L. M., and Collins, T. (1997) Inducible expression of Egr-1-dependent genes. A paradigm of transcriptional activation in vascular endothelium. *Circ Res* **81**, 457-461
155. Rondeau, V., Jain, A., Truong, V., and Srivastava, A. K. (2019) Involvement of the Akt-dependent CREB signaling pathway in hydrogen-peroxide-induced early growth response protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cells (1). *Can J Physiol Pharmacol* **97**, 885-892
156. Khachigian, L. M., Lindner, V., Williams, A. J., and Collins, T. (1996) Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. *Science* **271**, 1427-1431
157. Kapakos, G., Youreva, V., and Srivastava, A. K. (2012) Attenuation of endothelin-1-induced PKB and ERK1/2 signaling, as well as Egr-1 expression, by curcumin in A-10 vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* **90**, 1277-1285
158. Bouallegue, A., Simo Cheyou, E. R., Anand-Srivastava, M. B., and Srivastava, A. K. (2013) ET-1-induced growth promoting responses involving ERK1/2 and PKB signaling and Egr-1 expression are mediated by Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase-II in vascular smooth muscle cells. *Cell Calcium* **54**, 428-435
159. Youreva, V., Kapakos, G., and Srivastava, A. K. (2013) Insulin-like growth-factor-1-induced PKB signaling and Egr-1 expression is inhibited by curcumin in A-10 vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* **91**, 241-247
160. Youreva, V., and Srivastava, A. K. (2016) Early Growth Response Protein-1 Expression by Insulin-Like Growth Factor-1 Requires ROS-Dependent Activation of ERK1/2 and PKB Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Cell Biochem* **117**, 152-162
161. McCaffrey, T. A., Fu, C., Du, B., Eksinar, S., Kent, K. C., Bush, H., Jr., Kreiger, K., Rosengart, T., Cybulsky, M. I., Silverman, E. S., and Collins, T. (2000) High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis. *J Clin Invest* **105**, 653-662
162. Santiago, F. S., Lowe, H. C., Day, F. L., Chesterman, C. N., and Khachigian, L. M. (1999) Early growth response factor-1 induction by injury is triggered by release and paracrine activation by fibroblast growth factor-2. *Am J Pathol* **154**, 937-944
163. Wongcharoen, W., and Phrommintikul, A. (2009) The protective role of curcumin in cardiovascular diseases. *Int J Cardiol* **133**, 145-151
164. Iyoda, T., Zhang, F., Sun, L., Hao, F., Schmitz-Peiffer, C., Xu, X., and Cui, M. Z. (2012) Lysophosphatidic acid induces early growth response-1 (Egr-1) protein expression via

- protein kinase Cdelta-regulated extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **287**, 22635-22642
165. Wang, C. C., Sharma, G., and Draznin, B. (2006) Early growth response gene-1 expression in vascular smooth muscle cells effects of insulin and oxidant stress. *Am J Hypertens* **19**, 366-372
 166. Santiago, F. S., Lowe, H. C., Kavurma, M. M., Chesterman, C. N., Baker, A., Atkins, D. G., and Khachigian, L. M. (1999) New DNA enzyme targeting Egr-1 mRNA inhibits vascular smooth muscle proliferation and regrowth after injury. *Nat Med* **5**, 1264-1269
 167. Harja, E., Bucciarelli, L. G., Lu, Y., Stern, D. M., Zou, Y. S., Schmidt, A. M., and Yan, S. F. (2004) Early growth response-1 promotes atherogenesis: mice deficient in early growth response-1 and apolipoprotein E display decreased atherosclerosis and vascular inflammation. *Circ Res* **94**, 333-339
 168. Ghazvini-Boroujerdi, M., Clark, J., Narula, N., Palmatory, E., Connolly, J. M., DeFelice, S., Xu, J., Jian, B., Hazelwood, S., and Levy, R. J. (2004) Transcription factor Egr-1 in calcific aortic valve disease. *J Heart Valve Dis* **13**, 894-903
 169. Neyses, L., Nouskas, J., and Vetter, H. (1991) Inhibition of endothelin-1 induced myocardial protein synthesis by an antisense oligonucleotide against the early growth response gene-1. *Biochem Biophys Res Commun* **181**, 22-27
 170. Wada, Y., Fujimori, M., Suzuki, J., Tsukioka, K., Ito, K., Sawa, Y., Morishita, R., Kaneda, Y., Isobe, M., and Amano, J. (2003) Egr-1 in vascular smooth muscle cell proliferation in response to allo-antigen. *J Surg Res* **115**, 294-302
 171. Wolffe, A. P., and Guschin, D. (2000) Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. *J Struct Biol* **129**, 102-122
 172. Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* **21**, 381-395
 173. Chen, H. P., Zhao, Y. T., and Zhao, T. C. (2015) Histone deacetylases and mechanisms of regulation of gene expression. *Crit Rev Oncog* **20**, 35-47
 174. Cheung, W. L., Briggs, S. D., and Allis, C. D. (2000) Acetylation and chromosomal functions. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 326-333
 175. Livyatan, I., and Meshorer, E. (2013) The HDAC interaction network. *Mol Syst Biol* **9**, 671
 176. Seto, E., and Yoshida, M. (2014) Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a018713
 177. Zheng, X. X., Zhou, T., Wang, X. A., Tong, X. H., and Ding, J. W. (2015) Histone deacetylases and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **240**, 355-366
 178. Dai, Y., and Faller, D. V. (2008) Transcription Regulation by Class III Histone Deacetylases (HDACs)-Sirtuins. *Transl Oncogenomics* **3**, 53-65
 179. Parra, M., and Verdin, E. (2010) Regulatory signal transduction pathways for class IIa histone deacetylases. *Curr Opin Pharmacol* **10**, 454-460
 180. de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A. B. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**, 737-749
 181. Holbert, M. A., and Marmorstein, R. (2005) Structure and activity of enzymes that remove histone modifications. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 673-680

182. Yang, X. J., and Seto, E. (2008) The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 206-218
183. Guo, X., Ruan, H., Li, X., Qin, L., Tao, Y., Qi, X., Gao, J., Gan, L., Duan, S., and Shen, W. (2015) Subcellular Localization of Class I Histone Deacetylases in the Developing Xenopus tectum. *Front Cell Neurosci* **9**, 510
184. Zhou, B., Margariti, A., Zeng, L., and Xu, Q. (2011) Role of histone deacetylases in vascular cell homeostasis and arteriosclerosis. *Cardiovasc Res* **90**, 413-420
185. Kelly, R. D., and Cowley, S. M. (2013) The physiological roles of histone deacetylase (HDAC) 1 and 2: complex co-stars with multiple leading parts. *Biochem Soc Trans* **41**, 741-749
186. Grozinger, C. M., Hassig, C. A., and Schreiber, S. L. (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4868-4873
187. Yang, X. J., and Gregoire, S. (2005) Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Mol Cell Biol* **25**, 2873-2884
188. Seigneurin-Berny, D., Verdel, A., Curtet, S., Lemerrier, C., Garin, J., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2001) Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol* **21**, 8035-8044
189. Verdel, A., and Khochbin, S. (1999) Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J Biol Chem* **274**, 2440-2445
190. Tong, J. J., Liu, J., Bertos, N. R., and Yang, X. J. (2002) Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucleic Acids Res* **30**, 1114-1123
191. Fischer, D. D., Cai, R., Bhatia, U., Asselbergs, F. A., Song, C., Terry, R., Trogani, N., Widmer, R., Atadja, P., and Cohen, D. (2002) Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10. *J Biol Chem* **277**, 6656-6666
192. Verdin, E., Dequiedt, F., and Kasler, H. G. (2003) Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* **19**, 286-293
193. Sanders, B. D., Jackson, B., and Marmorstein, R. (2010) Structural basis for sirtuin function: what we know and what we don't. *Biochim Biophys Acta* **1804**, 1604-1616
194. Luo, X. Y., Qu, S. L., Tang, Z. H., Zhang, Y., Liu, M. H., Peng, J., Tang, H., Yu, K. L., Zhang, C., Ren, Z., and Jiang, Z. S. (2014) SIRT1 in cardiovascular aging. *Clin Chim Acta* **437**, 106-114
195. Winnik, S., Auwerx, J., Sinclair, D. A., and Matter, C. M. (2015) Protective effects of sirtuins in cardiovascular diseases: from bench to bedside. *Eur Heart J* **36**, 3404-3412
196. Gao, L., Cueto, M. A., Asselbergs, F., and Atadja, P. (2002) Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem* **277**, 25748-25755
197. Yanginlar, C., and Logie, C. (2018) HDAC11 is a regulator of diverse immune functions. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* **1861**, 54-59
198. Liu, H., Hu, Q., Kaufman, A., D'Ercole, A. J., and Ye, P. (2008) Developmental expression of histone deacetylase 11 in the murine brain. *J Neurosci Res* **86**, 537-543

199. Leslie, P. L., Chao, Y. L., Tsai, Y. H., Ghosh, S. K., Porrello, A., Van Swearingen, A. E. D., Harrison, E. B., Cooley, B. C., Parker, J. S., Carey, L. A., and Pecot, C. V. (2019) Histone deacetylase 11 inhibition promotes breast cancer metastasis from lymph nodes. *Nat Commun* **10**, 4192
200. Sun, L., Marin de Evsikova, C., Bian, K., Achille, A., Telles, E., Pei, H., and Seto, E. (2018) Programming and Regulation of Metabolic Homeostasis by HDAC11. *EBioMedicine* **33**, 157-168
201. Bhaskara, S. (2018) Histone deacetylase 11 as a key regulator of metabolism and obesity. *EBioMedicine* **35**, 27-28
202. Manea, S. A., Vlad, M. L., Fenyo, I. M., Lazar, A. G., Raicu, M., Muresian, H., Simionescu, M., and Manea, A. (2019) Pharmacological inhibition of histone deacetylase reduces NADPH oxidase expression, oxidative stress and the progression of atherosclerotic lesions in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice; potential implications for human atherosclerosis. *Redox Biol* **28**, 101338
203. Wright, L. H., and Menick, D. R. (2016) A class of their own: exploring the nondeacetylase roles of class IIa HDACs in cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **311**, H199-206
204. Fischle, W., Kiermer, V., Dequiedt, F., and Verdin, E. (2001) The emerging role of class II histone deacetylases. *Biochem Cell Biol* **79**, 337-348
205. Fischle, W., Emiliani, S., Hendzel, M. J., Nagase, T., Nomura, N., Voelter, W., and Verdin, E. (1999) A new family of human histone deacetylases related to *Saccharomyces cerevisiae* HDA1p. *J Biol Chem* **274**, 11713-11720
206. Martin, M., Kettmann, R., and Dequiedt, F. (2007) Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators. *Oncogene* **26**, 5450-5467
207. McKinsey, T. A., Zhang, C. L., and Olson, E. N. (2001) Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases. *Mol Cell Biol* **21**, 6312-6321
208. Harrison, B. C., Huynh, K., Lundgaard, G. L., Helmke, S. M., Perryman, M. B., and McKinsey, T. A. (2010) Protein kinase C-related kinase targets nuclear localization signals in a subset of class IIa histone deacetylases. *FEBS Lett* **584**, 1103-1110
209. Lu, J., McKinsey, T. A., Nicol, R. L., and Olson, E. N. (2000) Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4070-4075
210. Nishino, T. G., Miyazaki, M., Hoshino, H., Miwa, Y., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (2008) 14-3-3 regulates the nuclear import of class IIa histone deacetylases. *Biochem Biophys Res Commun* **377**, 852-856
211. Grozinger, C. M., and Schreiber, S. L. (2000) Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7835-7840
212. Zhang, C. L., McKinsey, T. A., Lu, J. R., and Olson, E. N. (2001) Association of COOH-terminal-binding protein (CtBP) and MEF2-interacting transcription repressor (MITR) contributes to transcriptional repression of the MEF2 transcription factor. *J Biol Chem* **276**, 35-39

213. Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M. J., Guenther, M. G., Lazar, M. A., Voelter, W., and Verdin, E. (2002) Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Mol Cell* **9**, 45-57
214. Lahm, A., Paolini, C., Pallaoro, M., Nardi, M. C., Jones, P., Neddermann, P., Sambucini, S., Bottomley, M. J., Lo Surdo, P., Carfi, A., Koch, U., De Francesco, R., Steinkuhler, C., and Gallinari, P. (2007) Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17335-17340
215. Wang, A. H., Kruhlak, M. J., Wu, J., Bertos, N. R., Vezmar, M., Posner, B. I., Bazett-Jones, D. P., and Yang, X. J. (2000) Regulation of histone deacetylase 4 by binding of 14-3-3 proteins. *Mol Cell Biol* **20**, 6904-6912
216. Pietruczuk, P., and Srivastava, A. K. (2017) Histone Deacetylases in Vascular Pathophysiology: Regulation by Vasoactive Peptides and Growth Factors. in *Mechanisms of Vascular Defects in Diabetes Mellitus*, Springer. pp 325-339
217. Zhang, C. L., McKinsey, T. A., Chang, S., Antos, C. L., Hill, J. A., and Olson, E. N. (2002) Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell* **110**, 479-488
218. Ginnan, R., Sun, L. Y., Schwarz, J. J., and Singer, H. A. (2012) MEF2 is regulated by CaMKII δ 2 and a HDAC4-HDAC5 heterodimer in vascular smooth muscle cells. *Biochem J* **444**, 105-114
219. Vega, R. B., Harrison, B. C., Meadows, E., Roberts, C. R., Papst, P. J., Olson, E. N., and McKinsey, T. A. (2004) Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. *Mol Cell Biol* **24**, 8374-8385
220. McKinsey, T. A., Zhang, C. L., and Olson, E. N. (2000) Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14400-14405
221. Greco, T. M., Yu, F., Guise, A. J., and Cristea, I. M. (2011) Nuclear import of histone deacetylase 5 by requisite nuclear localization signal phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* **10**, M110 004317
222. Chang, S., Bezprozvannaya, S., Li, S., and Olson, E. N. (2005) An expression screen reveals modulators of class II histone deacetylase phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8120-8125
223. Xu, X., Ha, C. H., Wong, C., Wang, W., Hausser, A., Pfizenmaier, K., Olson, E. N., McKinsey, T. A., and Jin, Z. G. (2007) Angiotensin II stimulates protein kinase D-dependent histone deacetylase 5 phosphorylation and nuclear export leading to vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 2355-2362
224. Rykx, A., De Kimpe, L., Mikhilap, S., Vantus, T., Seufferlein, T., Vandenheede, J. R., and Van Lint, J. (2003) Protein kinase D: a family affair. *FEBS Lett* **546**, 81-86
225. Li, H., Li, W., Gupta, A. K., Mohler, P. J., Anderson, M. E., and Grumbach, I. M. (2010) Calmodulin kinase II is required for angiotensin II-mediated vascular smooth muscle hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, H688-698
226. Ping, A., Yihao, T., Jingxing, D., Minkai, C., and Hesheng, L. (2012) Ca(2+)(+)/calmodulin-dependent protein kinase II mediates platelet-derived growth factor-induced human hepatic stellate cell proliferation. *Dig Dis Sci* **57**, 935-942

227. Abraham, S. T., Benscoter, H., Schworer, C. M., and Singer, H. A. (1996) In situ Ca²⁺ dependence for activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **271**, 2506-2513
228. McKinsey, T. A., Zhang, C. L., Lu, J., and Olson, E. N. (2000) Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* **408**, 106-111
229. McKinsey, T. A., and Olson, E. N. (2004) Cardiac histone acetylation--therapeutic opportunities abound. *Trends Genet* **20**, 206-213
230. Calalb, M. B., McKinsey, T. A., Newkirk, S., Huynh, K., Sucharov, C. C., and Bristow, M. R. (2009) Increased phosphorylation-dependent nuclear export of class II histone deacetylases in failing human heart. *Clin Transl Sci* **2**, 325-332
231. Nakamura, M., and Sadoshima, J. (2018) Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol* **15**, 387-407
232. Black, B. L., and Olson, E. N. (1998) Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 167-196
233. Usui, T., Morita, T., Okada, M., and Yamawaki, H. (2014) Histone deacetylase 4 controls neointimal hyperplasia via stimulating proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **63**, 397-403
234. Orr, A. W., Hastings, N. E., Blackman, B. R., and Wamhoff, B. R. (2010) Complex regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis. *J Vasc Res* **47**, 168-180
235. Usui, T., Okada, M., Mizuno, W., Oda, M., Ide, N., Morita, T., Hara, Y., and Yamawaki, H. (2012) HDAC4 mediates development of hypertension via vascular inflammation in spontaneous hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**, H1894-1904
236. Hansson, G. K., Libby, P., and Tabas, I. (2015) Inflammation and plaque vulnerability. *J Intern Med* **278**, 483-493
237. Yoon, S., and Eom, G. H. (2016) HDAC and HDAC Inhibitor: From Cancer to Cardiovascular Diseases. *Chonnam Med J* **52**, 1-11
238. Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., and Hrabeta, J. (2017) Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Int J Mol Sci* **18**
239. Mottamal, M., Zheng, S., Huang, T. L., and Wang, G. (2015) Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules* **20**, 3898-3941
240. Kee, H. J., Kwon, J. S., Shin, S., Ahn, Y., Jeong, M. H., and Kook, H. (2011) Trichostatin A prevents neointimal hyperplasia via activation of Kruppel like factor 4. *Vascul Pharmacol* **55**, 127-134
241. Choi, S. Y., Kee, H. J., Sun, S., Seok, Y. M., Ryu, Y., Kim, G. R., Kee, S. J., Pflieger, M., Kurz, T., Kassack, M. U., and Jeong, M. H. (2019) Histone deacetylase inhibitor LMK235 attenuates vascular constriction and aortic remodelling in hypertension. *J Cell Mol Med* **23**, 2801-2812
242. Kee, H. J., Ryu, Y., Seok, Y. M., Choi, S. Y., Sun, S., Kim, G. R., and Jeong, M. H. (2019) Selective inhibition of histone deacetylase 8 improves vascular hypertrophy, relaxation, and inflammation in angiotensin II hypertensive mice. *Clin Hypertens* **25**, 13

243. Kim, G. R., Cho, S. N., Kim, H. S., Yu, S. Y., Choi, S. Y., Ryu, Y., Lin, M. Q., Jin, L., Kee, H. J., and Jeong, M. H. (2016) Histone deacetylase and GATA-binding factor 6 regulate arterial remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *J Hypertens* **34**, 2206-2219
244. Bradner, J. E., West, N., Grachan, M. L., Greenberg, E. F., Haggarty, S. J., Warnow, T., and Mazitschek, R. (2010) Chemical phylogenetics of histone deacetylases. *Nat Chem Biol* **6**, 238-243
245. Mai, A., Massa, S., Pezzi, R., Simeoni, S., Rotili, D., Nebbioso, A., Scognamiglio, A., Altucci, L., Loidl, P., and Brosch, G. (2005) Class II (Ila)-selective histone deacetylase inhibitors. 1. Synthesis and biological evaluation of novel (aryloxopropenyl)pyrrolyl hydroxyamides. *J Med Chem* **48**, 3344-3353
246. Lemon, D. D., Harrison, B. C., Horn, T. R., Stratton, M. S., Ferguson, B. S., Wempe, M. F., and McKinsey, T. A. (2015) Promiscuous actions of small molecule inhibitors of the protein kinase D-class Ila HDAC axis in striated muscle. *FEBS Lett* **589**, 1080-1088
247. Choi, S. Y., Kee, H. J., Jin, L., Ryu, Y., Sun, S., Kim, G. R., and Jeong, M. H. (2018) Inhibition of class Ila histone deacetylase activity by gallic acid, sulforaphane, TMP269, and panobinostat. *Biomed Pharmacother* **101**, 145-154
248. Hu, T., Schreiter, F. C., Bagchi, R. A., Tatman, P. D., Hannink, M., and McKinsey, T. A. (2019) HDAC5 catalytic activity suppresses cardiomyocyte oxidative stress and NRF2 target gene expression. *J Biol Chem* **294**, 8640-8652
249. Borgatti, P., Martelli, A. M., Tabellini, G., Bellacosa, A., Capitani, S., and Neri, L. M. (2003) Threonine 308 phosphorylated form of Akt translocates to the nucleus of PC12 cells under nerve growth factor stimulation and associates with the nuclear matrix protein nucleolin. *J Cell Physiol* **196**, 79-88
250. Borgatti, P., Martelli, A. M., Bellacosa, A., Casto, R., Massari, L., Capitani, S., and Neri, L. M. (2000) Translocation of Akt/PKB to the nucleus of osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to proliferative growth factors. *FEBS Lett* **477**, 27-32
251. Intengan, H. D., and Schiffrin, E. L. (2001) Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* **38**, 581-587
252. Renna, N. F., de Las Heras, N., and Miatello, R. M. (2013) Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int J Hypertens* **2013**, 808353
253. Guerriero, J. L., Sotayo, A., Ponichtera, H. E., Castrillon, J. A., Pourzia, A. L., Schad, S., Johnson, S. F., Carrasco, R. D., Lazo, S., Bronson, R. T., Davis, S. P., Lobera, M., Nolan, M. A., and Letai, A. (2017) Class Ila HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages. *Nature* **543**, 428-432
254. Reichman, H., and Munitz, A. (2017) Harnessing class II histone deacetylases in macrophages to combat breast cancer. *Cell Mol Immunol* **14**, 575-577
255. Liu, Z., Tian, H., Hua, J., Cai, W., Bai, Y., Zhan, Q., Lai, W., Zeng, Q., Ren, H., and Xu, D. (2019) A CRM1 Inhibitor Alleviates Cardiac Hypertrophy and Increases the Nuclear Distribution of NT-PGC-1alpha in NRVMs. *Front Pharmacol* **10**, 465
256. Sun, Q., Chen, X., Zhou, Q., Burstein, E., Yang, S., and Jia, D. (2016) Inhibiting cancer cell hallmark features through nuclear export inhibition. *Signal Transduct Target Ther* **1**, 16010
257. Kazim, S., Malafa, M. P., Coppola, D., Husain, K., Zibadi, S., Kashyap, T., Crochiere, M., Landesman, Y., Rashal, T., Sullivan, D. M., and Mahipal, A. (2015) Selective Nuclear

- Export Inhibitor KPT-330 Enhances the Antitumor Activity of Gemcitabine in Human Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Ther* **14**, 1570-1581
258. Cardinale, J. P., Sriramula, S., Pariaut, R., Guggilam, A., Mariappan, N., Elks, C. M., and Francis, J. (2010) HDAC inhibition attenuates inflammatory, hypertrophic, and hypertensive responses in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **56**, 437-444
 259. Kimes, B. W., and Brandt, B. L. (1976) Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Exp Cell Res* **98**, 349-366
 260. Rao, R. S., Miano, J. M., Olson, E. N., and Seidel, C. L. (1997) The A10 cell line: a model for neonatal, neointimal, or differentiated vascular smooth muscle cells? *Cardiovasc Res* **36**, 118-126
 261. Mattingly, R. R., Gibbs, R. A., Menard, R. E., and Reiners, J. J., Jr. (2002) Potent suppression of proliferation of a10 vascular smooth muscle cells by combined treatment with lovastatin and 3-allylfarnesol, an inhibitor of protein farnesyltransferase. *J Pharmacol Exp Ther* **303**, 74-81
 262. Bassil, M., Li, Y., and Anand-Srivastava, M. B. (2008) Peroxynitrite inhibits the expression of G(i)alpha protein and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, H775-784
 263. Romar, G. A., Kupper, T. S., and Divito, S. J. (2016) Research Techniques Made Simple: Techniques to Assess Cell Proliferation. *J Invest Dermatol* **136**, e1-e7
 264. Liang, C. C., Park, A. Y., and Guan, J. L. (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* **2**, 329-333
 265. Ross, R. (1971) The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol* **50**, 172-186
 266. Anand-Srivastava, M. B., Franks, D. J., Cantin, M., and Genest, J. (1982) Presence of "Ra" and "P"-site receptors for adenosine coupled to adenylate cyclase in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **108**, 213-219

Annexes

Résultats supplémentaires

Des expériences additionnelles sont effectuées avec des CMLVs provenant de la paroi aortique de rats adultes Sprague-Dawley. Pour les matériels et méthodes, veuillez vous référer à la section des *Materials and Methods* de l'article scientifique présenté au Chapitre 2. Les CMLVs Sprague-Dawley sont extraites de la paroi aortique des rats Sprague-Dawley âgés de 12 semaines. L'isolation des CMLVs est décrite dans les articles (265,266).

Figure S1

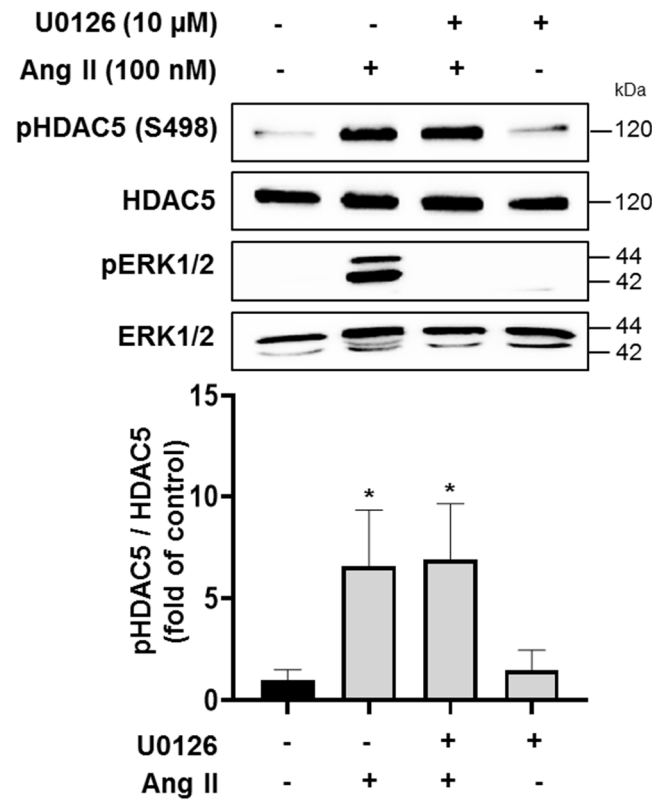


Figure S1. La voie ERK1/2 n'est pas impliquée dans la phosphorylation des HDAC5 induite par l'Ang II dans les CMLVs Sprague-Dawley.

Les CMLVs privées de sérum ont été prétraitées avec l'U0126 (inhibiteur des MEK1/2) pendant 30 minutes, avant d'être stimulées avec 100 nM d'Ang II pendant 15 minutes. Les lysats cellulaires ont été immunoblottés avec les anticorps pHDAC5 (S498), HDAC5, pERK1/2 et ERK1/2. Chaque condition est rapportée au contrôle (*fold of control*) qui est établi à 1. Le diagramme à barres représente la quantification de la pHDAC5 par rapport à HDAC5. * $p < 0,05$ par rapport au contrôle.

Figure S2

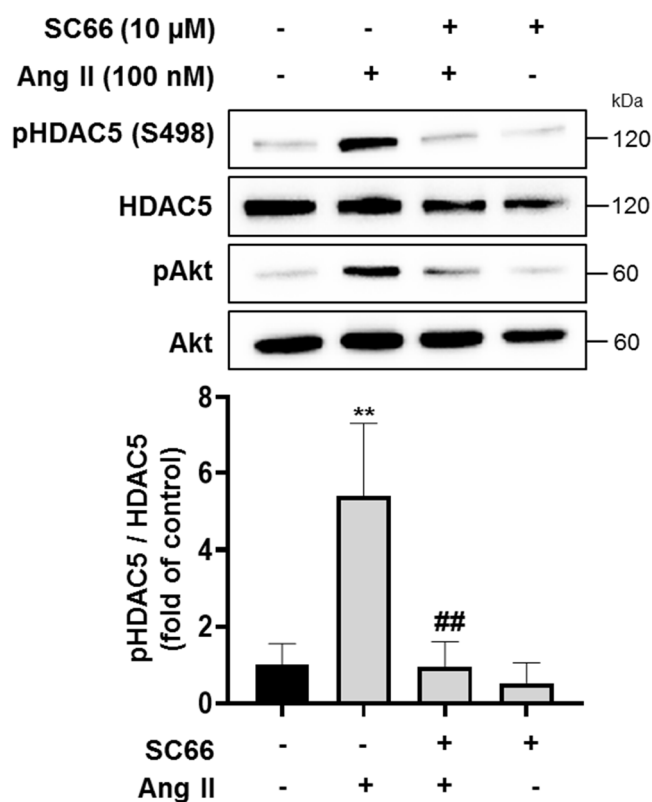


Figure S2. La voie Akt est impliquée dans la phosphorylation des HDAC5 induite par l'Ang II dans les CMLVs Sprague-Dawley.

Les CMLVs privées de sérum ont été prétraitées avec du SC66 (inhibiteur d'Akt) pendant 30 minutes, avant d'être stimulées avec 100 nM d'Ang II pendant 15 minutes. Les lysats cellulaires ont été immunoblottés avec les anticorps pHDAC5 (S498), HDAC5, pAkt et Akt. Chaque condition est rapportée au contrôle (*fold of control*) qui est établi à 1. Le diagramme à barres représente la quantification de la pHDAC5 par rapport à HDAC5. ** $p < 0,01$ par rapport au contrôle et ## $p < 0,01$ par rapport aux cellules traitées avec l'Ang II.

Figure S3

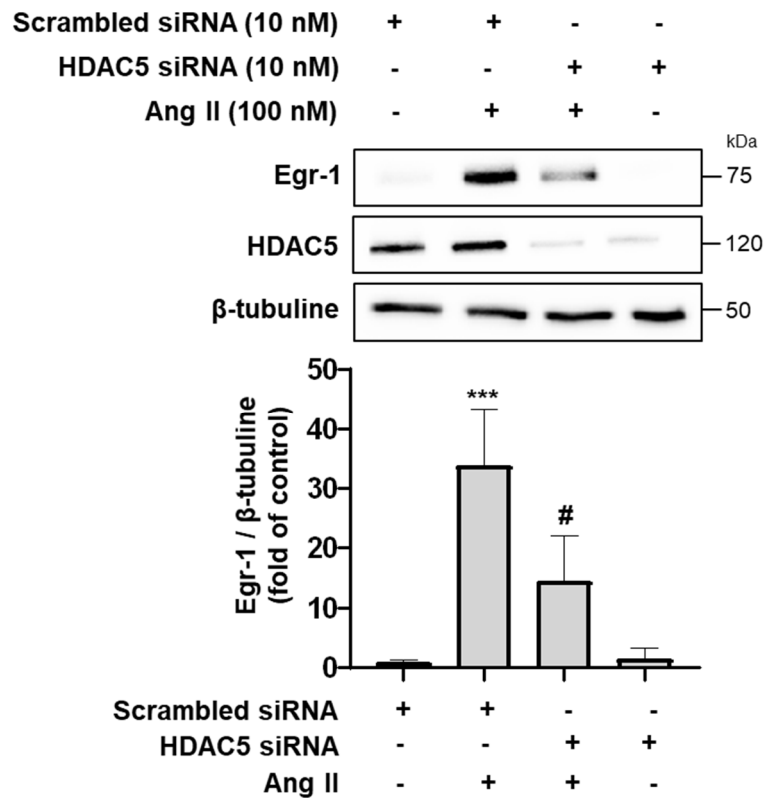


Figure 3S. La suppression des HDAC5 diminue l'expression de l'Egr-1 induite par l'Ang II dans les CMLVs Sprague-Dawley.

Les cellules ont été transfectées avec des siRNA des HDAC5 ou des siRNA de contrôle (*scrambled siRNA*) pendant 48h, avant d'être stimulées avec de l'Ang II pendant 60 min. Les lysats cellulaires ont été immunoblottés avec les anticorps Egr-1, HDAC5 et β -tubuline. Chaque condition est rapportée au contrôle (*fold of control*) qui est établi à 1. Le diagramme à barres représente la quantification de l'Egr-1 par rapport à la β -tubuline. *** $p < 0,001$ par rapport au contrôle et # $p < 0,05$ par rapport aux cellules traitées avec l'Ang II.